

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

ЧЕРНЫХ

Анатолий Игоревич

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

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Салмина Алла Борисовна

Красноярск – 2018

Оглавление

Введение.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Цель исследования.....	8
Задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	9
Теоретическая значимость работы.....	9
Практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту.....	11
Степень достоверности.....	11
Апробация результатов.....	11
Публикации.....	12
Структура и объем диссертации.....	12
Финансовая поддержка диссертации.....	12
Благодарности.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Современные представления о болезни Альцгеймера.....	14
1.1.1. Распространенность и этиология болезни Альцгеймера.....	14
1.1.2. Молекулярные механизмы развития болезни Альцгеймера.....	15
1.2. Инсулиновая сигнализация и метаболизм глюкозы в ЦНС.....	21
1.2.1. Инсулин в головном мозге. Общие представления.....	21
1.2.2. Влияние инсулина на когнитивные функции.....	22
1.2.3. Инсулин и церебральный метаболизм глюкозы.....	24
1.3. Нарушение сигнальных путей инсулина при болезни Альцгеймера.....	26
1.3.1. Развитие инсулинорезистентности.....	26
1.3.2. Влияние инсулинорезистентности на мозг.....	27
1.3.3. Дизрегуляция инсулиновой сигнализации в головном мозге при болезни Альцгеймера.....	29
1.4. Нейровоспаление в головном мозге и инсулинорезистентность.....	32

1.4.1. Воспаление при болезни Альцгеймера и метаболических расстройствах	32
1.4.2. Активация провоспалительных факторов и сигнальных путей в клетке при повреждении инсулиновой сигнализации в нейронах при болезни Альцгеймера.....	34
1.4.3. Формирование инфламмасом при болезни Альцгеймера.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1. Объекты исследования.....	37
2.2. Дизайн эксперимента и группы животных.....	37
2.3. Введение олигомеров бета-амилоида в головной мозг.....	39
2.4. Нейроповеденческое тестирование мышей.....	41
2.4.1. Тест «Условно-рефлекторного замирания» (Fear conditioning, FC).....	41
2.5. Иммуногистохимическое окрашивание.....	43
2.5.1. Подготовка тканей для анализа.....	43
2.5.2. Проведение иммуногистохимии.....	44
2.5.3. Подсчет колокализации экспрессии маркеров.....	45
2.6. Окраска с тиофлавином S для детекции олигомеров бета-амилоида.....	46
2.7. Иммуноферментный анализ.....	47
2.7.1. Определение уровня инсулина.....	47
2.7.2. Определение уровня лактата.....	47
2.7.3. Определение уровня интерлейкина 1 бета (IL-1 β).....	48
2.8. Статистический анализ.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
3.1. Результаты нейроповеденческого тестирования «Условно-рефлекторного замирания».....	51
3.1.1. Результаты нейроповеденческого тестирования CD1 мышей с моделированием болезни Альцгеймера.....	51
3.1.2. Результаты нейроповеденческого тестирования Nlrp3 нокаутных мышей	55
3.1.3. Результаты нейроповеденческого тестирования NLPR3 КО мышей с моделированием болезни Альцгеймера.....	59

3.2. Экспрессия маркеров инсулинорезистентности в норме и при болезни Альцгеймера.....	62
3.2.1. Результаты инъекции бета-олигомеров 1-42.....	62
3.2.2. Результаты определения экспрессии IRAP и GLUT4.....	63
3.3. Экспрессия NLRP3 инфламмасом в клетках нейрональной природы в норме и при болезни Альцгеймера.....	75
3.4. Экспрессия маркера глиальных клеток и маркеров инсулинорезистентности у NLRP3 нокаутных мышей.....	77
3.4.1. Сокращение количества астроцитов и изменение их морфологии в мозге NLRP3 нокаутных мышей.....	77
3.4.2. Паттерн экспрессии IRAP и GLUT4 у <i>Nlrp3</i> нокаутных мышей.....	79
3.5. Экспрессия субстрата инсулинового рецептора, фосфорилированного по серину (pIRS-Ser), у <i>Nlrp3</i> нокаутных мышей с инъекцией бета-амилоида A β 1-42.....	84
3.6. Результаты определения лактата, инсулина и IL-1 β	88
3.6.1. Результаты определения лактата.....	88
3.6.2. Результаты определения инсулина.....	89
3.6.3. Результаты определения IL1 β	92
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	94
4.1. Эмоциональная память, локальная инсулинорезистентность и нейровоспаление при моделировании болезни Альцгеймера.....	95
4.2. Роль NLRP3 инфламмасом в реализации когнитивных функции и инсулин-регулируемом перемещении глюкозного транспортера.....	106
4.3. Вклад нейровоспаления, вызванного действием растворимых олигомеров бета-амилоида A β , на эмоциональную память и передачу сигнала инсулина...	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
ВЫВОДЫ.....	126
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	128
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	130

Введение

Актуальность темы исследования

Немногие проблемы в современной биомедицине вызвали столько же научных интересов и общественного беспокойства, как болезнь Альцгеймера (БА). Практически неизвестная широкой публике четыре десятилетия назад, БА распространилась на 40 миллионов пациентов во всем мире. Истинное число должно быть намного выше, учитывая данные, что болезнь начинается в мозге не менее, чем за 2-3 десятилетий до начала клинических проявлений. Поскольку молекулярные исследования БА начались всерьез в начале 1980-х годов, тысячи ученых и специалистов в области медицины углубились во все аспекты этого сложного многофакторного синдрома, надеясь помочь пациентам и не дать другим людям страдать от этой патологии в будущем [120].

Следовательно, значительный интерес теперь сосредоточен на понимании нейротоксических механизмов, вызванных растворимыми олигомерами бета-амилоида, с целью создания эффективных терапевтических стратегий для лечения БА. Болезнь Альцгеймера является нейродегенеративным расстройством с 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 является центральной для инициирования патогенеза БА [226]. Однако многие изменения, характерные для БА, начинаются еще задолго до образования нерастворимых амилоидных бляшек. Клиническая стадия болезни Альцгеймера сопровождается синаптической потерей, селективной гибелью нейронов, снижением передачи нейротрансмиттеров и нейровоспалением [132].

Известно, что амилоидная (или A β) гипотеза стала доминирующей моделью патогенеза БА и определяет развитие потенциальных методов лечения [226]. Амилоидная каскадная гипотеза постулирует, что бета-амилоид (A β) играет

центральную роль при болезни Альцгеймера и может приводить к окислительному стрессу, дисфункции синапсов и нейронов, аберрантному нейрогенезу и как следствие к нейродегенерации [120]. Недавние исследования также подчеркнули роль олигомеров А β в синаптических нарушениях, предполагая, что это, прежде всего, только один из нескольких других сигналов, которые нарушают целостность мозговых функций [38]. В настоящий момент все больше исследователей считают, что решающее значение в развитии болезни Альцгеймера играют олигомерные формы амилоид-бета, и их образование объясняет раннюю потерю памяти при БА [255].

В последние годы все большее внимание исследователей сосредоточено на изучении роли формирования локальной инсулинорезистентности в патогенезе болезни Альцгеймера [27]. Поэтому общепризнанной становится точка зрения о том, что именно инсулинорезистентность в ткани головного мозга обуславливает развитие когнитивной дисфункции и способствует прогрессированию дегенеративных изменений [20, 54, 69]. Существовавшее ранее мнение о том, что ткань головного мозга не является инсулин-зависимой, уступило место теории о важной роли инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в регуляции ключевых механизмов функционирования нейронов и астроцитов – их гомеостаз, развитие и выживание, синаптическая пластичность – что отражается в регуляции памяти, когнитивных функций и иных форм поведения. [145].

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.

В последнее время часто для обозначения болезни Альцгеймера используется термин – сахарный диабет третьего типа, поскольку патологические события, сопровождающие данную патологию патогенетически связаны с инсулинорезистентностью [19]. Понятие «метаболический синдром», объединяющее метаболический синдром и когнитивную дисфункцию при хронической нейродегенерации, изначально было предложено для нарушений при

болезни Альцгеймера, но позднее было распространено на другие типы нейродегенерации [19]. Инсулинорезистентность в головном мозге развивается и при старении [19], что может быть связано с дисфункцией гематоэнцефалического барьера и/или результатом действия различных факторов [222].

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 [6]. Согласно этим результатам, локальная инсулинорезистентность и изменение центрального метаболизма глюкозы, может служить ранним маркером для диагностики болезни Альцгеймера [67].

Следовательно, локальная инсулинорезистентность в соответствующих регионах головного мозга (в частности, миндалевидном теле) может быть одной из ключевых причин когнитивных дефицитов при хронической нейродегенерации. Именно поэтому, в последние несколько лет в литературе активно обсуждаются вопросы применения инсулина для коррекции когнитивной дисфункции при старении или нейродегенеративных заболеваниях [177].

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 [86]. У пациентов с БА наблюдаются существенные нарушения запоминания, связанного с эмоциональными ассоциациями, что свидетельствует о вовлеченности миндалевидного тела головного мозга в этот процесс.

Интересно, что в последние 3 года появились единичные работы, связанные с изучением роли миндалевидного тела головного мозга при

инсулинорезистентности, например, применительно к пищевому поведению, а также о молекулярных механизмах эффектов инсулина в этой структуре головного мозга [40].

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 нейронах и астроцитах головного мозга при нейродегенерации, и каким образом они связаны 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 бета-амилоида A β 1-42 на особенности экспрессии и функциональной активности молекул-компонентов инсулинорезистентности (IRAP, GLUT4) в клетках миндалевидного тела головного мозга мышей дикого типа.
3. Изучить вклад NLRP3 инфламмасом в прогрессирование нарушений эмоциональной сферы при экспериментальной болезни Альцгеймера.
4. Определить роль NLRP3 инфламмасом в регуляции экспрессии глюкозного транспортера GLUT4 и IRAP в клетках миндалевидного тела головного мозга *Nlrp3* нокаутных мышей.

5. Исследовать вклад нейровоспаления, вызванного действием растворимых олигомеров бета-амилоида A β , на передачу сигнала инсулина, изменение метаболизма глюкозы и провоспалительного интерлейкина IL1 β 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 болезни Альцгеймера.

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

Впервые описана роль инфламмасом NLRP3 в формировании локальной инсулинорезистентности при моделировании болезни Альцгеймера. 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 работы

Установлены молекулярные механизмы дизрегуляции эффектов инсулина при болезни Альцгеймера, которые наблюдаются при формировании нарушений эмоциональной сферы, прогрессии нейровоспаления и нейродегенерации, а именно показано, что NLRP3-ассоциированное воспаление в миндалевидном теле головного мозга вносит вклад в нарушение экспрессии молекул инсулинового

сигнального пути GLUT4, IRAP, приводит к увеличению экспрессии aberrантного инсулинового субстрата, что сопровождается нарушениями в этапах формирования эмоциональной памяти.

Практическая значимость работы

Установленная роль подавления экспрессии NLRP3 при нейровоспалении, ассоциированном с развитием нейродегенерации, может стать фундаментальной основой при разработке новых фармакологических подходов к коррекции болезни Альцгеймера. Продемонстрированная роль базального уровня NLRP3 инфламмасом в процессах формирования памяти, внутриклеточной транслокации глюкозного транспортера GLUT4 и инсулиновой сигнализации

Таким образом, в ходе работы представлено экспериментальное и теоретическое обоснование новых подходов к патогенетической терапии нейродегенерации при болезни Альцгеймера.

Методология и методы исследования

Работа имеет 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.

Положения, выносимые на защиту

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

2. В миндалевидном теле головного мозга аккумуляция бета-амилоида 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 бета-амилоида.

Степень достоверности

Научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием системного подхода к решению поставленной цели, с использованием современных методов (пато)физиологии, достаточной выборкой исследуемых животных в соответствии с основными регламентами работы с лабораторными живыми объектами и большим объемом материала, который подвергнут адекватному статистическому анализу.

Апробация результатов

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 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.

Структура и объем диссертации

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 282 источников, в том числе 28 отечественных и 254 зарубежных.

Список литературы и ссылки на него в тексте оформлены с использованием программы работы с библиографическими списками «Zotero» и автоматическим подключением ГОСТ 7.0.5.-2008 (numeric, sorted alphabetically, Russian; <https://www.zotero.org/>).

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).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность:

- к.фарм.н. Яне Валерьевне Гориной, д.б.н. Лопатиной Ольге Леонидовне за совместную работу в области нейробиологии и нейрохимии, за помощь в организации и реализации исследовательской деятельности, анализе полученных данных и подготовки рукописей к публикации в реферируемых научных журналах;
- коллективу НИИ молекулярной медицины и патобиохимии (ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, руководитель – д.м.н., профессор, А.Б.Салмина) за помощь в подготовке, представлении, публичной защите и обсуждении диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о болезни Альцгеймера

1.1.1. Распространенность и этиология болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) является смертельным нейродегенеративным расстройством, которое патологически определяется обширной потерей нейронов и накоплением внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и внеклеточных амилоидных бляшек в головном мозге. Генетические, биохимические и neuropathological данные свидетельствуют о том, что агрегация патологического белка бета-амиоида является центральной для инициирования патогенеза БА [120]. Нейрофибриллярная патология сильно коррелирует с нейронной дисфункцией и прогрессированием клинической фазы БА. Клиническая стадия болезни Альцгеймера также сопровождается синаптической потерей, селективной гибелью нейронов, снижением передачи нейротрансмиттеров и нейровоспалением [15, 132].

В отсутствие значительного прорыва в лечении и глубокого понимания патогенеза оценка распространенности заболевания во всем мире превосходит 115 миллионов человек к 2050 году [257].

Считается, что болезнь Альцгеймера является самой частой причиной деменции в пожилом и старческом возрасте [11, 12]. Согласно основным международным исследованиям, в возрасте 60 лет каждый десятый страдает болезнью Альцгеймера, причем процент людей с болезнью Альцгеймера увеличивается с возрастом и составляет около 3% в возрасте 65-74 лет, 17% - в возрасте между 75-84, и 32% у людей 85 лет и старше [36],[25].

Болезнь Альцгеймера имеет две основные формы: семейную или раннюю БА, которая составляет менее 5% всех случаев БА и обычно диагностируется до 65 лет, с явным генетическим риском через унаследованные мутации в трех основных генах: белок-предшественник амиоида (APP), пресенилин 1 (PSEN1) и

пресенилин 2 (PSEN2) [120]. Спорадическая форма или поздняя болезнь Альцгеймера составляет подавляющее большинство всех случаев БА и обычно диагностируется после 65 лет. Наиболее важным фактором риска для развития спорадической формы патологии является преклонный возраст, поскольку, заболеваемость, как уже было описано выше, увеличивается с возрастом [185].

БА характеризуется постепенным ухудшением когнитивных функций со значительными нарушениями памяти, наличием функциональных, поведенческих и личностных изменений. К патологическим признакам БА относятся амилоидные бляшки, состоящие из белка бета-амилоида, и нейрофибриллярные клубки, которые изначально появляются в височной коре и уже потом распространяются по всей коре [62].

Классически клиническую картину болезни Альцгеймера можно рассматривать как совокупность патофизиологических последствий с длительной бессимптоматической стадией без каких-либо когнитивных или поведенческих симптомов, но с появлением устойчивых патологических изменений в головном мозге. Затем наступает постепенная прогрессия нарушений, приводящая к умеренным когнитивным нарушениям и, в конечном итоге, к деменции с грубым когнитивным дефицитом [18, 233].

1.1.2. Молекулярные механизмы развития болезни Альцгеймера

Патогенез болезни Альцгеймера является предметом споров со времени, когда Аллоис Альцгеймер в 1907 году впервые описал данное заболевание. С того времени были выдвинуты несколько гипотез для объяснения этого многофакторного расстройства, такие как холинергическая, амилоидная, тау гипотезы и гипотеза нейровоспаления [154]. Недавние исследования также подчеркнули роль олигомеров A β в синаптических нарушениях, предполагая, что

это, прежде всего, только один из нескольких других сигналов, которые нарушают целостность мозговых функций [17, 38].

Хотя уже более века известно, что прогрессирующее накопление амилоидов разнообразного белкового состава в различных органах вызывает различные заболевания, идея, выдвинутая Джорджем Гленнером [109], что конкретный амилоидогенный белок, накапливающийся при болезни Альцгеймера – бета-амилоид (Аβ), может быть причиной данной патологии, со значительным скептицизмом был рассмотрен в течение последующих лет. Амилоидная гипотеза оставалась противоречивой, но накопление данных из многих доклинических и клинических исследований все больше и больше подтверждает ее (Рисунок 1).

Амилоидная (или Аβ) гипотеза стала доминирующей моделью патогенеза БА и определяет развитие потенциальных методов лечения [226] и методов моделирования [21]. Амилоидная каскадная гипотеза постулирует, что бета-амилоид (Аβ) играет центральную роль в патологии БА и приводит к окислительному стрессу, синаптической / нейронной дисфункции и нейродегенерации [1, 120].

Аβ - это компонент сенильных бляшек, свойственных БА. Формируется данный белок путем нарушенного процессинга из белка-предшественника амилоида APP [25]. Данный белок-предшественник же в свою очередь является мембранным интегральным белком, который последовательно расщепляется α-, β- и γ-секретазами с образованием неамилоидогенных или амилоидогенных белков Аβ [123], [155] (Рисунок 1).

Аβ1-42 представляет собой Аβ-пептид с 42 аминокислотами, который продуцируется амилоидогенным путем. Хотя большинство белков Аβ, включая Аβ42 и Аβ40, секретируются внеклеточно, было показано, что внутриклеточный Аβ42 инициирует митохондриальный окислительный стресс и участвует в патогенезе БА [191]. Это приводит к дисбалансу между продукцией и клиренсом Аβ [220].

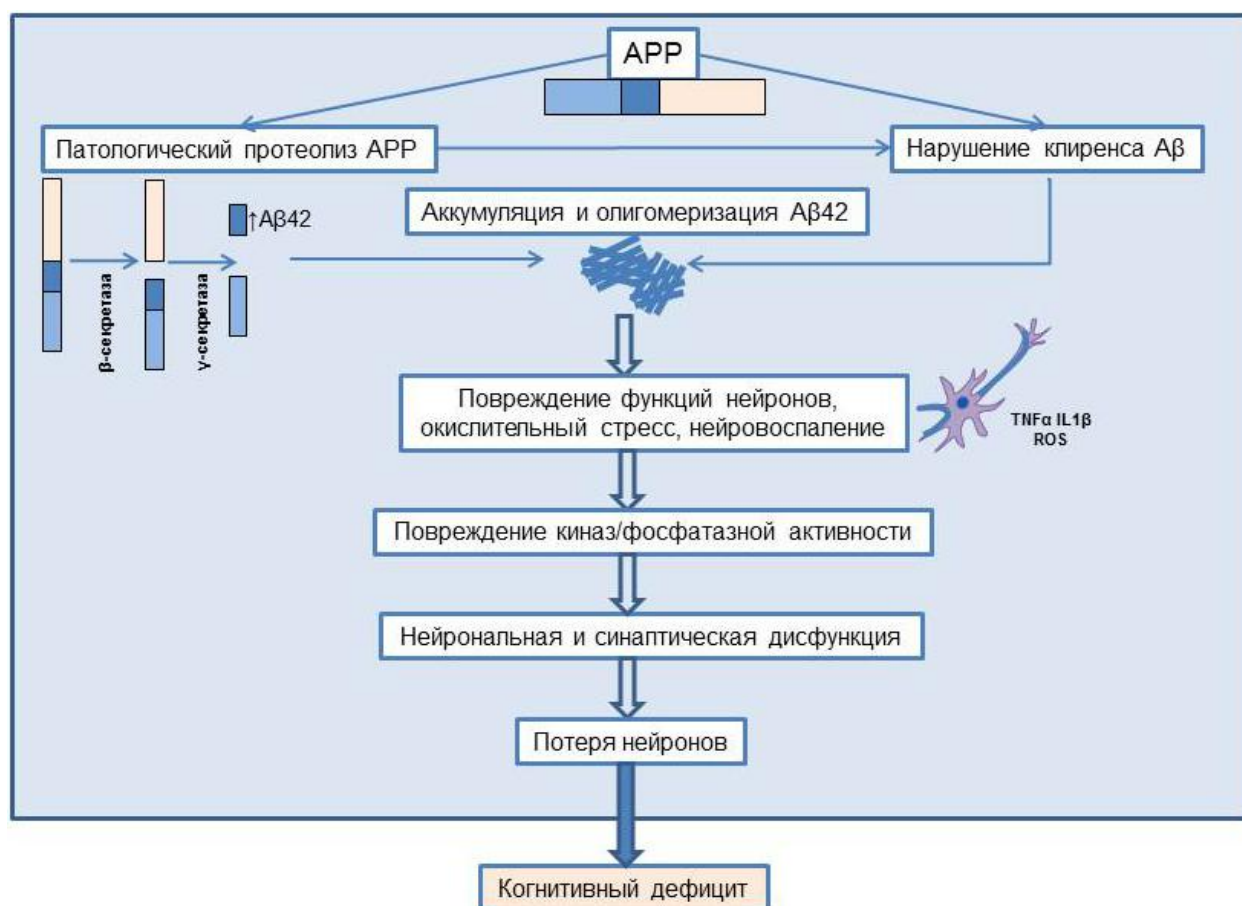


Рисунок 1 – Последовательность основных патогенетических событий, происходящих при болезни Альцгеймера согласно амилоидной гипотезе. Оригинальный рисунок, выполненный по данным литературы. Сокращения: APP – белок предшественник амилоида, ROS – активные формы кислорода.

Затем Aβ пептиды начинают агрегироваться в растворимые олигомеры и сливаются уже с формированием фибрилл, нерастворимых бета-структур и оказываются, в конечном счете, депонированы в диффузных старческих бляшках [13, 121]. Некоторые недавние исследования показали, что олигомеры Aβ42 образуются в результате совместной активности как нейронов, так и связанных с ними астроцитов [73]. Было замечено, что олигомеры Aβ42 запускают окислительное повреждение клеток, стимулируют гиперфосфорилирование белка тау, что, в конечном счете, приводит к повреждающим эффектам на синапсы [154]. Появление бета-амилоидных бляшек приводит к активации микроглии [156], что способствует образованию и высвобождению провоспалительных цитокинов,

включая IL-1 β , TNF α и IFN γ . В свою очередь эти цитокины стимулируют близлежащие астроциты и нейроны, приводят к продукции дополнительного количества олигомеров A β 42, тем самым активируя распространение A β 42 [73]. В настоящее время считается, что именно A β олигомеры ответственны за нейрональную и васкулярную дегенерацию в головном мозге при болезни Альцгеймера[30].

Предыдущие исследования показали, A β физиологически расщепляется с помощью пептидаз: инсулин-деградирующего фермента, неприлизина и эндотелин-конвертирующего фермента [269]. Кроме того, для клиренса A β существует несколько путей, включая гематоэнцефалический барьер, объемный поток интерстициальной жидкости, арахноидальные ворсинки, лимфатическая система и лимфатические пути [250]. Кроме того, агрегаты A β могут быть фагоцитированы и деградированы микроглией, периваскулярными макрофагами и астроцитами. Таким образом, дефектные системы очистки могут приводить к дисбалансу между продукцией и клиренсом A β в головном мозге, что приводит к последующей нейронной дисфункции и нейродегенерации [120].

На сегодняшний день мы знаем, что A β олигомеры связываются с рецепторами клеточной поверхности и вызывают множественные aberrантные сигнальные пути, включая нарушение сигнализации кальция [94], окислительный стресс [79], нарушения рецепторов, связанных с пластичностью, и увеличение высвобождения глутамата из пресинаптических окончаний [94], повреждение гематоэнцефалического барьера [245]. Кроме того, они стимулируют ингибирование долгосрочного потенцирования (LTP) и ухудшение памяти [271]. Основные проявления действия олигомеров бета-амилоида представлены на рисунке 2 (Рисунок 2).

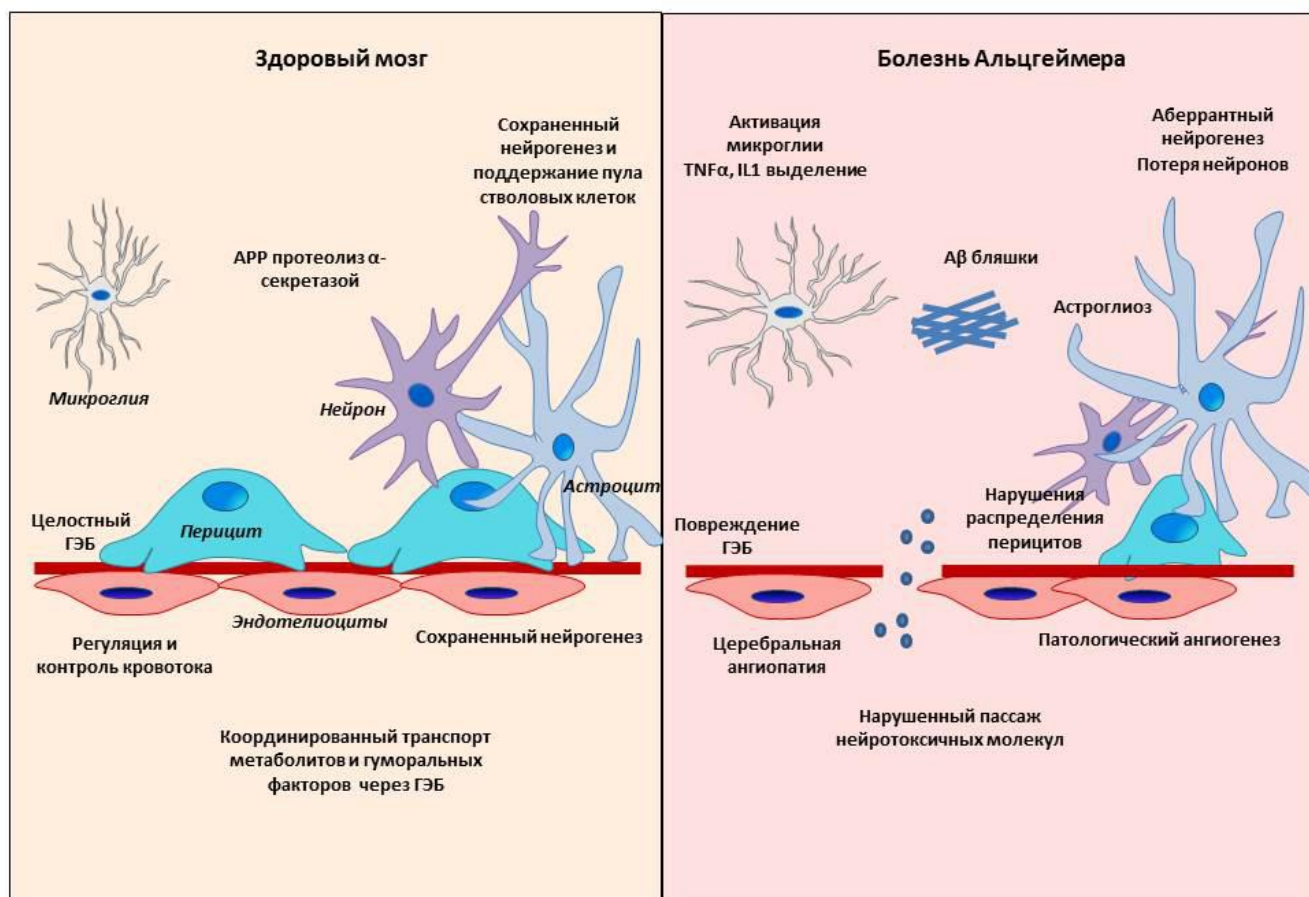


Рисунок 2 – Основные события в головном мозге в норме и при действии олигомеров Аβ при болезни Альцгеймера. Оригинальный рисунок, выполненный по данным литературы.

Кроме того, патогенез БА, по-видимому, подразумевает патогенетическую связь с иммунными механизмами в головном мозге. Олигомеры бета-амилоида индуцируют аберрантную реактивность астроцитов и микроглии в мозге мышей и нечеловеческих приматов [157]. Недавние исследования показали, что активация микроглии и системы комплемента играет ключевую роль в потере синапсов и прогрессировании нейродегенерации при БА, кроме того данные изменения наблюдаются еще до этапа формирования амилоидных бляшек [133].

Научные прорывы за последние десятилетия расширили наши знания о клеточных и молекулярных аспектах БА [4, 22]. Тем не менее, БА остается в значительной степени идиопатическим, и терапии, которая эффективно борется с

прогрессированием болезни, все еще отсутствуют. Учитывая, что болезнь Альцгеймера в значительной степени ассоциируется с потерей памяти, неудивительно, что подавляющее большинство исследований посвящено механизмам, связанным с ухудшением когнитивных способностей [99].

Центральная метаболическая дисфункция – это хорошо зарекомендовавшая себя теория развития болезни Альцгеймера, о чем свидетельствует гипометаболизм глюкозы мозга, который может наблюдаться за десятилетия до развития БА [233]. Кроме того, существует связь между метаболическими заболеваниями и развитием БА. Пациенты с инсулинорезистентностью, сахарным диабетом 2 типа, гиперлипидемией, ожирением или другими метаболическими заболеваниями имеют повышенный риск развития болезни Альцгеймера и аналогичных патологий, таких как сосудистая деменция [81]. Кроме того, в настоящее время рассматриваются и другие современные теории развития болезни Альцгеймера, основные из которых отражены на рисунке 3. (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Современные теории развития болезни Альцгеймера.

Оригинальный рисунок, выполненный по данным литературы.

1.2. Инсулиновая сигнализация и метаболизм глюкозы в ЦНС

1.2.1. Инсулин в головном мозге. Общие представления

Инсулин это пептидный гормон, секретируемый преимущественно бета-клетками поджелудочной железы с хорошо охарактеризованными функциями в метаболизме глюкозы/липидов, регуляции сосудов и роста клеток [182]. Современные данные свидетельствуют о том, что инсулин играет жизненно важную роль в центральной нервной системе [54]. Инсулин легко проникает через ГЭБ с помощью рецептор-опосредованного процесса [267]. Кроме того, несколько областей в головном мозге (гипоталамус, сосудистые сплетения и т. д.) могут служить более быстрым местом входа для периферического инсулина в ЦНС. Продолжается дискуссия о продукции инсулина в ЦНС. В исследованиях на животных было описано присутствие мРНК инсулина в некоторых областях мозга [46]. Клинические исследования подтвердили присутствие С-пептида в спинномозговой жидкости, который секретируется во время продукции инсулина в бета-клетках поджелудочной железы [54].

Инсулин связывается с инсулиновым рецептором (IR), который имеет две различные изоформы (IR-A и IR-B) [6]. Изформа А инсулинового рецептора находится в центральной нервной системе. Она обладает более высоким сродством к инсулину, по сравнению с IR-B рецепторами, локализованными в жировой ткани, печени и скелетных мышцах [105]. Недавно была описана локализация IR-B в клетках астроглиальной природы [103], с потенциальной ролью в опосредовании эффектов инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF) в ЦНС. Важно отметить, что инсулиноподобный рост фактор-1 и 2 (IGF-1, IGF-2) также могут связываться с IR, но сродство у них ниже, чем у инсулина [149].

IRs представляют собой тирозинкиназы с альфа и бета-субъединицами. Взаимодействие с α -субъединицей приводит к аутофосфорилированию остатков тирозина на β -субъединицах [19]. β -субъединица в свою очередь взаимодействует

с субстратами ИР, в основном субстратами 1 и 2 (IRS-1 и IRS-2) [28]. IRS-1, 2, в конечном счете, связывают инсулин с двумя основными путями передачи сигналов: путь PI3K/Akt и путь Ras/ERK [78] (Рисунок 4). ИР обнаруживаются как в нейронах, так и в астроцитах [101]. Более высокая плотность локализации характерна для лимбической системы (гиппокамп, гипоталамус, обонятельная луковица, миндалевидное тело, кора головного мозга, и перегородка), имеющей стратегическое значение для пищевого поведения и когнитивных функций [124].

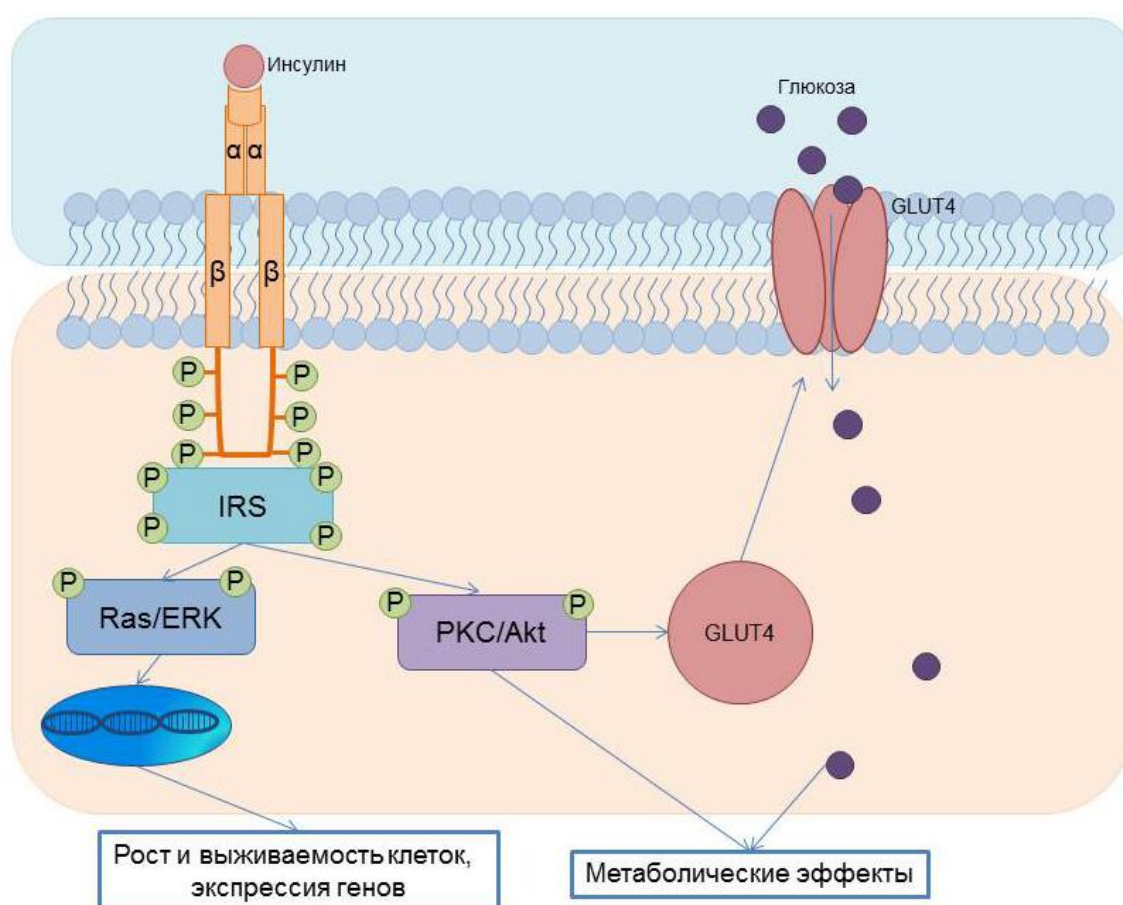


Рисунок 4 – Основные пути инсулиновой сигнализации в ЦНС.
Оригинальный рисунок, выполненный по данным литературы.

1.2.2. Влияние инсулина на когнитивные функции

Острое повышение периферического инсулина (обычно в ответ на увеличение экзогенной или эндогенной глюкозы) способствует переносу

инсулина через ГЭБ в ЦНС, что опосредует и облегчает его роль для множества важных функций мозга [149]. Региональная локализация IR в гиппокампе предлагает, что инсулин может влиять на память, одну из основных задач поддерживаемых гиппокампом и тесно связанными с ним структурами.

Было показано, что интрацеребровентрикулярное введение инсулина у крыс улучшает пространственную память и выполнение поведенческого теста «Пассивное избегание» [155]. В клинических исследованиях, использующих острое внутривенное введение инсулина с поддержанием эугликемии, было описано улучшение вербальной памяти [143]. Аналогичное улучшение памяти наблюдалось после введения интраназального инсулина [23, 37]. В целом, вышеуказанные данные создают прочную основу для объяснения роли инсулина в формировании памяти, одной из ключевых когнитивных областей, повреждаемых при БА.

Весьма интересно, что процесс обучения может изменять экспрессию IR и их функционирование в некоторых областях мозга [29]. Так было показано, что у крыс тренировка пространственной памяти приводит к увеличению мРНК IR в CA1 области и зубчатой извилине гиппокампа и приводит к увеличению накопления IR в пределах гиппокампа. Кроме того, тренировка усиливала инсулин-стимулированное фосфорилирование тирозина IR *in vitro* у обученных животных [280]. Эти результаты показывают, что само обучение может влиять как на концентрацию IR, так и на инсулиновую сигнализацию в гиппокампе и потенциально в других областях головного мозга. Таким образом, вероятно, что инсулин играет ключевую роль в обучении и формировании памяти с учетом локализации IR в гиппокампе, изменения экспрессии IR в гиппокампе, характерных для пространственного обучения, и улучшения памяти после введения инсулина как у животных, так и в клинических исследованиях. Однако до сих пор остается слабо изученным, как инсулин оказывает влияние на когнитивные функции; предполагается участие нескольких механизмов [3, 185].

1.2.3. Инсулин и церебральный метаболизм глюкозы

Одним из возможных механизмов, посредством которого инсулин может модулировать когнитивные функции, является влияние на мозговой энергетический обмен. Важность глюкозы в ЦНС демонстрируется непропорциональной скоростью метаболизма глюкозы в мозге относительно большинства органов и тканей. В то время как мозг составляет лишь 2% от средней массы тела, он использует около 25% глюкозы в организме и 20% потребляемого кислорода для удовлетворения метаболических нужд [48]. Энергия, получаемая при метаболизме глюкозы, используется для поддержания нейронального градиента ионов и ремоделирования мембран клеток и многих других процессов. Инсулин, несомненно, имеет решающее значение для периферического энергетического обмена в жировой ткани, тканях печени и скелетных мышцах [221]. До недавнего времени мозг (а именно метаболизм глюкозы) в значительной степени считался независимым от инсулина. Тем не менее, недавние исследования выявили важную роль инсулина в мозговом/периферическом метаболизме и обеспечении других функций [54].

Церебральный метаболизм глюкозы повышается после восстановления базальных уровней инсулина у метаболически здоровых пациентов. Метаболические изменения наиболее заметны в областях коры. Это показывает, что нормальные базальные уровни периферического инсулина могут играть важную роль в поддержании метаболизма глюкозы в мозге [53]. В недавнем исследовании взрослых с метаболической дисфункцией, было сообщено об увеличении метаболизма глюкозы. Интересно, что метаболизм глюкозы не изменялся при гиперинсулинемии у здоровых людей [129]. Эти результаты подтверждают мнение, что инсулин может модифицировать метаболизм глюкозы в мозге и что эффекты могут различаться в зависимости от метаболического статуса.

Инсулин, вероятно, оказывает региональное влияние на метаболизм церебральной глюкозы из-за локализованного распределения транспортеров глюкозы (GLUT) [206]. Независимые от инсулина GLUT1 и GLUT3 традиционно считались единственными переносчиками глюкозы GLUT в мозге. Эти GLUT экспрессируются в ГЭБ, в нейронах и глии [227]. Однако в настоящее время очевидно, что инсулин-зависимые переносчики глюкозы, например GLUT4 и GLUT8, также обнаруживаются в областях головного мозга, ответственных за восприятие, память, когнитивные функции, движение и пищевое поведение [206]. Транспортер GLUT4 транслоцируется к мембране под воздействием инсулина [201]. Следует особо отметить, что инсулин-зависимый GLUT4 локализован в регионах, в которых локализуются инсулиновые рецепторы и инсулин [224].

Транслокация GLUT4 сопровождается инсулин-регулируемой аминопептидазой (IRAP) [223]. IRAP был впервые идентифицирован как белок, который сопровождает чувствительный к инсулину переносчик глюкозы GLUT4 в специализированных везикулярных компартментах жировых и мышечных клеток [274]. Движение этих пузырьков GLUT4 / IRAP к плазматической мембране находится под жестким контролем инсулина, что облегчает вплоть до десятикратного увеличения поглощение глюкозы в клетку. IRAP является единственным трансмембранным ферментом семейства аминопептидаз M1, который содержит большой внутриклеточный домен. В специализированных везикулах GLUT4 этот аминоконцевой хвост IRAP, состоящий из 109 аминокислот, обращен в цитоплазму. Возможно, что аминоконцевой цитоплазматический хвост IRAP играет значительную роль в сохранении или перемещении содержащих GLUT4 везикул в клетках, чувствительных к инсулину [64, 199].

IRAP экспрессируется в специализированных везикулах, содержащих GLUT4 в нейронах отделов лимбической системы. Оба транслоцируются из пузырьков на клеточную поверхность в ответ на определенные стимулы, такие как инсулин [92], хотя эта транслокация не гарантирует активность GLUT4, так как везикулы также должны соответствующим образом сливаться с

плазматической мембраной [160]. GLUT4 в значительной степени способствует усвоению столь необходимой глюкозы во время когнитивных функций, связанных с памятью [134].

1.3. Нарушение сигнальных путей инсулина при болезни Альцгеймера

1.3.1. Развитие инсулинорезистентности

Инсулинорезистентность развивается при таком событии, когда взаимодействие инсулина с его рецепторами не приводит к должному ответу в клетке. Хотя этот термин чаще всего применяется для уменьшения клиренса глюкозы из крови и входа в целевые ткани [207], он также может относиться к способности инсулина участвовать в каноническом пути сигнализации в любой ткани. На периферии это явление сопровождается увеличением высвобождения инсулина из поджелудочной железы для компенсации хронически повышенных уровней глюкозы и/или увеличенного количества жировой ткани, что требует инсулина для метаболизма глюкозы. Длительное повышение уровня системного инсулина может в конечном итоге привести к дисфункции при передаче инсулина [80]. Это хроническое повышение уровня периферического инсулина также влияет на доступность и функционирование инсулина. Проникновение инсулина через ГЭБ является транспортер-опосредованным [46]. В здоровом состоянии, острый, кратковременный рост периферического инсулина приводит к увеличению инсулина в ЦНС, когда он попадает в мозг. Хроническая периферическая гиперинсулинемия приводит к снижению транспортеров инсулина через ГЭБ, что, в свою очередь, уменьшает количество инсулина, которое может попасть в головной мозг [46]. Этот дефицит инсулин в ЦНС потенциально может привести к снижению памяти и нейропротективных эффектов, ухудшению синаптической передачи, а также способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний [79]. Важно отметить, что отрицательное

воздействие инсулинорезистентности происходит за несколько лет до развития клинических признаков сахарного диабета. Ранние дефекты инсулиновой сигнализации могут быть также связаны с патологическими изменениями мозга и появляться за десятилетия до клинических симптомов заболевания [217].

1.3.2. Влияние инсулинорезистентности на мозг

Центральная инсулиновая резистентность выявляется не только в условиях сахарного диабета 2 типа, но и при нейродегенеративных заболеваниях, при этом следует отметить, что по своим молекулярным механизмам и клиническим проявлениям и последствиям такая локальная центральная инсулинорезистентность отличается от периферической инсулиновой резистентности [28].

В метаболически здоровом состоянии острое повышение уровня инсулина оказывает благотворное влияние на когнитивную функцию. Однако хронически повышенный инсулин значительно снижает уровень своих опосредованных эффектов [186]. В подтверждение этого заключения можно привести исследования, демонстрирующие нарушение обучения животных с моделью сахарного диабета 2 типа, а также наблюдаемый когнитивный дефицит в клинических исследованиях среди пациентов с данной патологией [114].

Кроме того, резистентность к инсулину влияет на структуру и функцию мозга, приводит к изменению объема мозга и метаболизма глюкозы в мозге. Были описаны сниженные объемы гиппокампа у пожилых людей с нарушенной толерантностью к глюкозе, что также сопровождалось более низкими баллами при оценке памяти. Аналогичным образом, еще одно исследование подтвердило, что у пациентов с более высоким уровнем глюкозы натощак и гликозилированным гемоглобином наблюдается снижение памяти и способности к обучению [144]. Гипометаболизм глюкозы наиболее очевидно был зафиксирован в лобной, париеттемопоральной коре [43]. Это доказывает, что

инсулинорезистентность влияет на аналогичные области мозга, как при болезни Альцгеймера, подтверждая мнение о том, что резистентность к инсулину может способствовать нейродегенеративным заболеваниям. Кроме того, неоднократно было показано, что диабет является сильным предиктором когнитивного спада у пожилых людей [52]. Фактически, у людей с сахарным диабетом может быть в два раза больше вероятность снижения когнитивных функций в течение 5 лет относительно тех, у кого нет этой патологии [253]. Точно так же, несколько эпидемиологических исследований описали ассоциацию между резистентностью к инсулину и когнитивными нарушениями и/или развитием деменции у пожилых людей [68].

Когнитивные нарушения не ограничиваются изменениями в обучении и памяти, но имеются и другие нарушения. Например, было показано, что инсулинорезистентность связана со снижением скорости обработки заданий, познавательной гибкости и моторных навыков [61]. Учитывая текущие данные, инсулинорезистентность должна считаться важным фактором риска для развития когнитивной дисфункции.

Таким образом, клинические работы и экспериментальные исследования на животных моделях предполагают, что резистентность к инсулину оказывает пагубное влияние на когнитивные функции, в частности на обучение и память. Учитывая важное влияние инсулинорезистентности, весьма важным становится изучение метаболических путей, которые могут быть затронуты при таких условиях, а также как эти пути связаны с развитием болезни Альцгеймера и другими нейродегенеративными расстройствами.

1.3.3. Дизрегуляция инсулиновой сигнализации в головном мозге при болезни Альцгеймера

Инсулинорезистентность затрудняет способность клеток поддерживать энергетический гомеостаз. Головной мозг при болезни Альцгеймера сопровождается изменениями, аналогичными тем, которые наблюдаются в периферических тканях при сахарном диабете, включая метаболический стресс и нейровоспаление [246]. Такие механизмы объясняют периферическую инсулинорезистентность при сахарном диабете 2 типа и нарушают сигнализацию инсулина в головном мозге при БА. Недавние исследования действительно продемонстрировали наличие существенных общих черт между нейропатогенными механизмами, вызванными олигомерами бета-амилоида, которые накапливаются в головном мозге при БА и вызывают потерю нейронов и синапсов, а также механизмами, связанными с периферической резистентностью к инсулину при диабете [71].

В настоящее время предложено достаточно большое количество доводов, объясняющих нарушенную сигнальную трансдукцию в мозге при БА. Среди наиболее часто цитируемых – сниженный внеклеточный инсулин, оцененный в спинномозговой жидкости, уменьшенная общая или клеточная поверхность экспрессии инсулиновых рецепторов и снижение сродства инсулиновых рецепторов к инсулину [77, 247]. Однако есть причины сомневаться в том, что это основные факторы, способствующие снижению передачи сигналов инсулина головного мозга, наблюдаемых при БА. Дефицит внеклеточного инсулина в мозге при БА неясен, учитывая противоположные результаты, полученные в цереброспинальной жидкости [175]. Аналогичным образом, дефицит в общем содержании рецепторов к инсулину в тканях головного мозга при БА не был обнаружен в исследованиях, в которых использовался соответствующий по возрасту контроль, и фракционирование клеток не выявило недостатков в уровнях инсулиновых рецепторов на поверхности клеток [246]. Хотя связывание инсулина

с инсулиновым рецептором может быть снижено в мозговой ткани при БА [213], инсулину все же удастся активировать каталитический домен инсулинового рецептора на уровне 71-74% от нормальных уровней даже в гиппокампальной формации при БА [184]. Как отмечено выше, значительно большее снижение чувствительности к инсулину наблюдается уже после связывания с инсулиновым рецептором в головном мозге при БА, начиная с IRS-1, который активируется инсулином только на 10% от нормального уровня в гиппокампальной формации [246].

Таким образом, наиболее вероятной причиной снижения передачи сигналов инсулина в головном мозге при БА является, инсулинорезистентность из-за дисфункционального IRS-1. Это, вероятно, отражает A β -индуцированную глиальную секрецию провоспалительных цитокинов. Среди ранних аномалий при БА - повышенная растворимость A β [135], мономеров которых объединяются в олигомеры, которые позже могут собираться в фибриллы, которые образуют амилоидные бляшки или амилосфероиды [172, 241]. Также в начале БА [95]. олигомеры A β и возникающие фибриллы (то есть протофибриллы) активируют микроглию, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF- α [125]. Такая активация микроглии может быть критическим событием в патогенезе БА, учитывая недавнее открытие того, что выключение гена в модели БА, кодирующего микроглиальный рецептор (то есть NOD-подобный рецептор 3) и воспринимающего воспалительные патогены, включая A β , предотвращает развитие патологии альцгеймеровского типа и когнитивных нарушений, которые обычно происходят в этой модели патологии на животных [126]. Через нейронные рецепторы микроглиальные IL-1, IL-6 и TNF- α активируют серин-киназы IRS-1, известные под аббревиатурами IKK, JNK и Erk2 [184]. Таким образом, олигомеры A β , вводимые культурам нейронов или в церебральные желудочки, заметно повышают фосфорилирование серина IRS-1 (IRS-1 pS) на нескольких участках, а именно S312, S616 и / или S636 (S307, S612 и S632 у грызунов) [55].

Повышенный нейронный IRS-1 pS является значительным в коре головного мозга и гиппокампальной формации при БА и, по-видимому, является основной причиной дисфункции IRS-1 при БА [176, 246]. Поскольку такое фосфорилирование ингибирует передачу индуцированной инсулином рецепторной активации к «нисходящим» молекулам, становится понятно, что это общепринятая причина инсулинорезистентности в периферических тканях, особенно мышечной ткани [57]. То же самое, по-видимому, происходит и в мозге с БА, где индуцированная инсулином активация IRS-1 последовательно снижается в тканях со значительно повышенными уровнями IRS-1 pS616 и IRS-1 pS636, которые, таким образом, являются потенциальными биомаркерами устойчивости к инсулину в головном мозге [246]. Как и ожидалось, уровни этих биомаркеров- кандидатов значительно коррелируют с образованием олигомерных Аβ бляшек и отрицательно связаны с когнитивными способностями, включая эпизодическую и рабочую память [246].

Таким образом, хронически повышенный нейронный IRS-1 pS, вызванный индуцируемыми Аβ олигомерами провоспалительными процессами, является наиболее вероятным объяснением инсулинорезистентности в головном мозге при БА и основным фактором когнитивных дефицитов. Это может объяснить, почему периферическая резистентность к инсулину из-за ожирения и / или сахарного диабета усугубляет резистентность к инсулину мозга при БА [2, 163] и моделях болезни Альцгеймера на животных [130]. Ожирение и сахарный диабет 2 типа являются, по сути, факторами риска для БА [204] и связаны с повышенными сосудистыми провоспалительными цитокинами [31]. Особенно при БА, когда повреждена мозговая сосудистая сеть, цитокины могут пересекать гематоэнцефалический барьер [89] и активировать серин-киназы IRS-1 таким же образом, что и цитокины, полученные из микроглии. Периферическая инсулинорезистентность также может повысить мозговой IRS-1 pS за счет уменьшения клиренса Аβ в головном мозге, потому что инсулин облегчает печеночный клиренс Аβ плазмы, вмешательство которого нарушает мозговой клиренс этого пептида [170] (Рисунок 5).

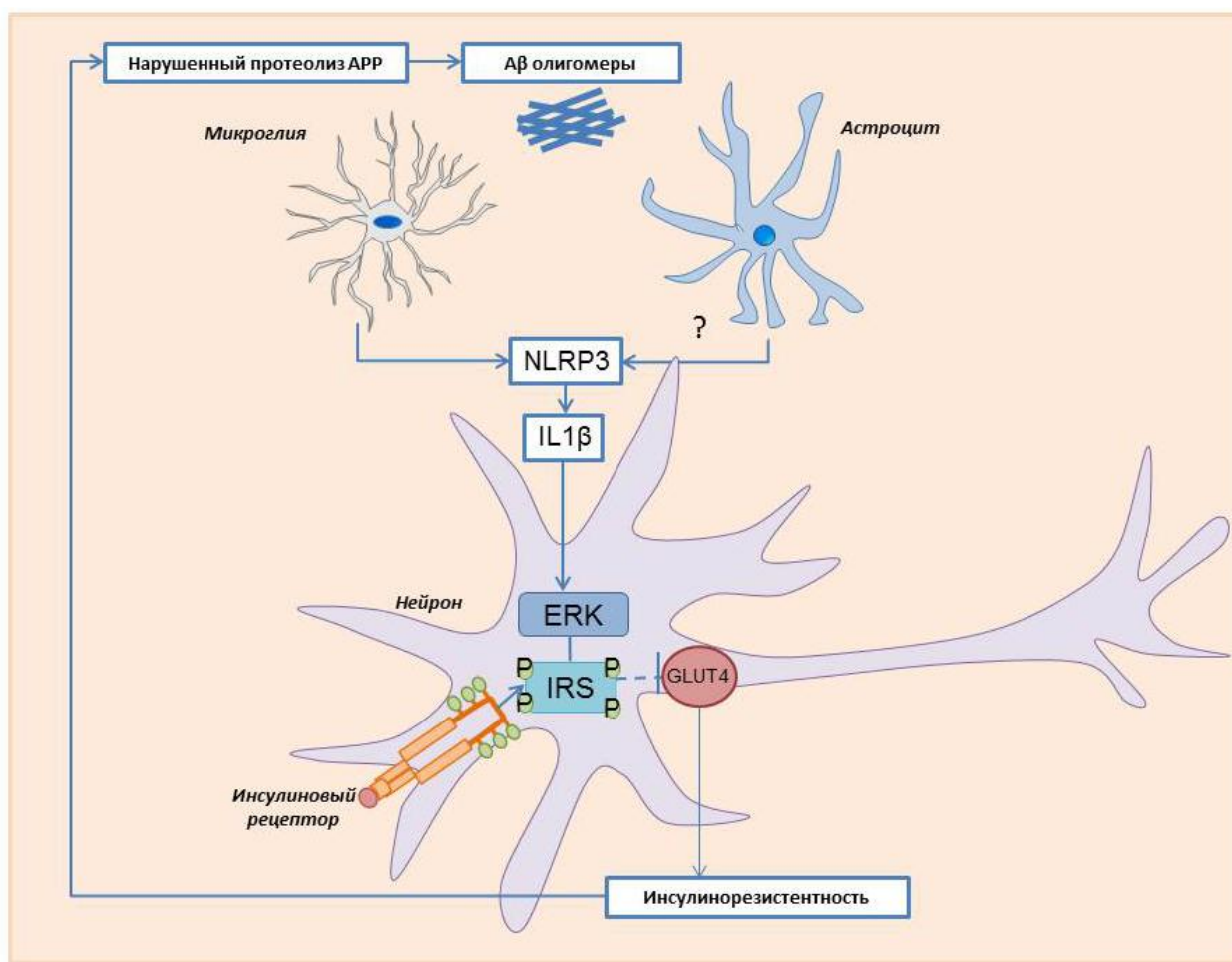


Рисунок 5 – Возможные молекулярные механизмы формирования локальной инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера. Оригинальный рисунок, выполненный по данным литературы.

1.4. Нейровоспаление в головном мозге и инсулинорезистентность

1.4.1. Воспаление при болезни Альцгеймера и метаболических расстройствах

Воспаление является важной особенностью сахарного диабета и болезни Альцгеймера и считается, что этот процесс играет важную роль в патогенезе этих двух патологий. Воспаление является важной частью защитных механизмов организма от множества патологических агентов, таких как инфекции и травмы, и включает как образование растворимых факторов, так и активацию

специализированных клеток, которые мобилизуются для ответной реакции и восстановления нормальной физиологии организма [93].

Считается, что подобные воспалительные процессы происходят в головном мозге и периферических тканях. В результате проведения некоторых исследований было установлено наличие воспалительных маркеров при болезни Альцгеймера в ткани головного мозга, включая повышенные уровни цитокинов/хемокинов и глиоза (особенно микроглиоз) [200]. Кроме того, наблюдалось повышение концентрации воспалительных медиаторов в крови, включая фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкин 6 (IL-6) и IL-1 β у пациентов с БА [244]. С другой стороны, активация макрофагов в жировой ткани и повышенная продукция провоспалительных цитокинов являются ключевыми особенностями патофизиологии метаболических нарушений. Недавнее исследование показало, что повышенные уровни TNF- α , экспрессирующиеся в жировой ткани тучных людей, вызывают периферическую инсулинорезистентность. Таким образом, как в головном мозге, так и в периферических тканях, неконтролируемое или хроническое воспаление сопровождается инсулинорезистентностью [78]. Интересно отметить, что воспаление также лежит в основе гипоталамической дисфункции при ожирении [225]. Новые доказательства указывают, что именно воспаление и стресс эндоплазматического ретикулума - критические патогенетические события в установлении гипоталамической и периферической резистентности к инсулину при метаболических нарушениях [41]. У животных с моделью сахарного диабета и ожирением, воспалительный ответ в гипоталамусе, особенно посредством активации TNF- α и пути I κ B α киназы (IKK)- β /ядерного фактора- κ B, является важной частью механизма, лежащего в основе патогенеза данного заболевания [174]. Следовательно, патология гиппокампа при БА и патология гипоталамуса при ожирении имеют общие патогенетические пути, ассоциированные с воспалением [78].

1.4.2. Активация провоспалительных факторов и сигнальных путей в клетке при повреждении инсулиновой сигнализации в нейронах при болезни Альцгеймера

При периферической инсулинорезистентности, и сахарном диабете в том числе повышенные уровни TNF- α инициируют сериновое фосфорилирование IRS-1 стресс-киназами, блокируя передачу сигналов инсулина [128, 183]. В головном мозге, TNF- α главным образом секретируется микроглиальными клетками в ответ на травму, инфекции или аномальному накоплению агрегатов патологического белка. Уровни TNF- α повышаются в микрососудах мозга и цереброспинальной жидкости при БА, а также в мозге мышей с трансгенной моделью БА [215]. Изначальные сведения, что нарушенная передача сигналов инсулина в нейронах при БА связана с провоспалительной сигнализацией исходила из того, что олигомеры бета-амилоида вызывают ингибирование IRS-1 посредством активации TNF- α /JNK [55]. Эти представления были подтверждены и показано, что в основе нарушенной периферической инсулиновой сигнализации при сахарном диабете и центральной локальной инсулинорезистентности в головном мозге при БА лежат общие механизмы. А именно было продемонстрировано, что I κ B α киназа и двухцепочечная RNA-зависимая протеинкиназа увеличиваются при болезни Альцгеймера, и они приводят к ингибированию IRS-1 в нейрональных клетках гиппокампа [164].

1.4.3. Формирование инфламмасом при болезни Альцгеймера

Хроническое слабовыраженное воспаление наблюдается у пациентов с ожирением и представляет собой тесную связь между ожирением, инсулинорезистентностью и сахарным диабетом 2 типа [84]. Хотя многие исследования показывают, что увеличение жировой ткани является важным

шагом в управлении усиленным воспалением, лежащие в основе молекулярные механизмы, модулирующие этот процесс, все еще неясны [238]. Было показано, что иммунные клетки, включая провоспалительные макрофаги (M1-подобные), проникают в жировую ткань и влияют на ее гомеостаз, увеличивая продукцию цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и TNF [59].

Макрофаги и другие иммунные клетки врожденного иммунитета могут вызывать воспалительные реакции путем обнаружения патоген- или связанных с опасностью молекулярных структур (PAMPs или DAMP) с использованием широкого спектра рецепторов паттерн-распознавания (PRR) [10, 56]. Несколько типов PRR были идентифицированы до настоящего момента, включая toll-like receptors (TLR), и NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors) [42]. Наиболее изученным является семейство NLR, содержащее цитозольный белок NLRP3 [228].

NLRP3 является цитозольным мультипротеиновым комплексом, способным контролировать активность каспазы-1 и участвовать в созревании IL1 β и IL-18. Носит название «инфламмасома» [5]. Инфламмасома является белковой молекулой, состоящей из трех основных компонентов: (1) Семейство NLR (NOD-подобных рецепторов), такие как NLRP3 (NOD-подобное рецепторное семейство, пириновый домен, содержащий 3) и NALP1 или IPAF (фактор активации криопроотеазы), (2) каспаза-1 и (3) ASC (ассоциированный с апоптозом спектоподобный белок, содержащий CARD домен), адаптерный белок, необходимый для сборки NLR и стабилизации комплексов каспазы-1 / NLR [16, 82].

После активации с помощью PAMP или DAMP, NLRP3 взаимодействует с адаптерным белком ASC. Затем домен CARD на ASC связывается с CARD на прокаспазе-1, формируя инфламмасому NLRP3. Это приводит к аутокатализу прокаспазы-1, генерируя активную каспазу-1, которая индуцирует превращение незрелых форм IL-1 β и IL-18 в их активные формы, которые секретируются [76].

Убедительные данные свидетельствуют о том, что активация воспаления NLRP3 посредством DAMPs играет центральную роль в воспалении, вызванном

ожирением, инсулинорезистентностью и сахарным диабетом 2 типа [159]. Роль инфламмасом NLRP3 в патогенезе ожирения подтверждалась данными показывая, что мыши *Nlrp3*^{-/-} и *Asc*^{-/-} нокаутные (КО) защищены от ожирения и инсулинорезистентности, индуцированной диетой с высоким содержанием жиров [254] [263]. Кроме того, активация NLRP3 инфламмасом/каспазы-1, по-видимому, является ключевым регулятором дифференцировки адипоцитов и направляет адипоциты к фенотипу с инсулинорезистентностью [237].

Следовательно, ограничение калорий и снижение веса у тучных субъектов с сахарным диабетом уменьшают экспрессии генов *Nlrp3* и IL-1 адипоцитах, улучшая чувствительность к инсулину [254]. Однако некоторые исследования не смогли найти связь между формированием инфламмасом NLRP3 и ожирением или инсулинорезистентностью [188]. Понимание молекулярных механизмов хронического воспаления остается серьезной медицинской проблемой [188] [212]. Таким образом, для понимания связи между формированием NLRP3 инфламмасом и инсулинорезистентностью требуются дальнейшие исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты 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. Мыши содержались по 5-6 особей в клетке при температурном режиме 21-22°C со свободным доступом к воде и корму и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь. Все манипуляции выполнялись во время светлой фазы дня. В ходе эксперимента были предприняты все усилия для сведения к минимуму страданий животных и сокращения их числа согласно принципам работы с животными (Принцип 3 «R»). Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского Парламента и Совета Европейского союза (2010/63/EC) и с разрешения биоэтической комиссии при КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

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.

2.2. Дизайн эксперимента и группы животных

Настоящее исследование состояло из трех блоков (Рисунок 6):

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 бета-амилоида A β , на передачу сигнала инсулина

В связи с данным дизайном эксперимента в каждой части были использованы следующие группы животных:

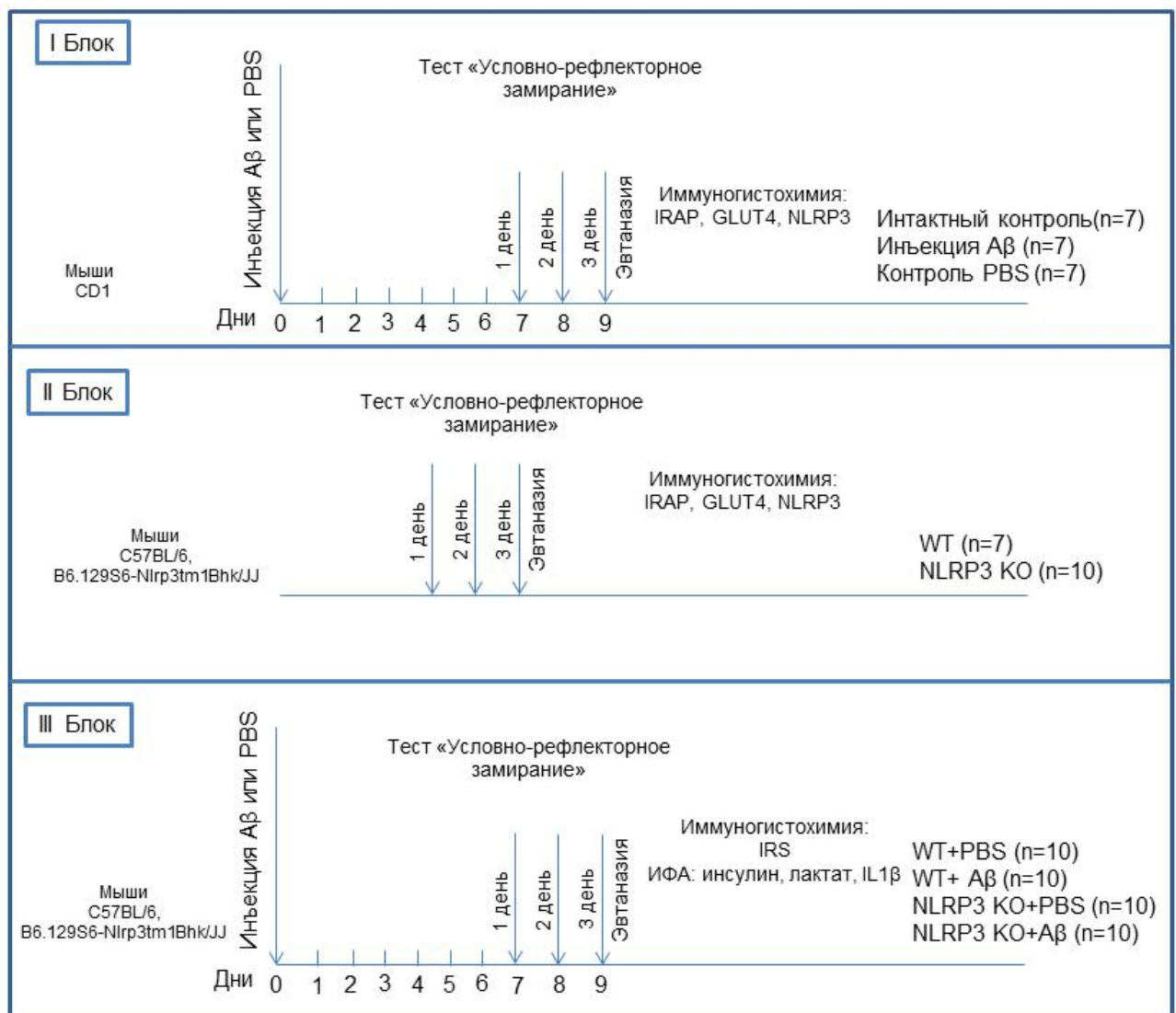


Рисунок 6 – Дизайн эксперимента.

I Блок: *1 группа* – контрольная группа ложно-оперированных мышей CD1 с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в CA1 зону гиппокампа (n=7). Обозначения в тексте – контроль (PBS), ложно-оперированные животные.

2 группа – экспериментальная группа мышей CD1 с введением A β 1-42 в CA1 зону гиппокампа (n=7). Через 10 дней после интрагиппокампальной инъекции для обеих групп проводили транскардиальную перфузию после эвтаназии с забором головного мозга. Обозначения в тексте – экспериментальная группа, инъекция бета-амилоида A β 1-42 (A β).

II Блок: *1 группа* – контрольная группа мышей C57BL/6 (n=7). Обозначения в тексте – WT.

2 группа – *Nlrp3*-нокаутные мыши (n=10). Обозначения в тексте – *Nlrp3*^{-/-} или NLRP3 KO.

III Блок: *1 группа* – контрольная группа мышей C57BL/6 с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в CA1 зону гиппокампа (n=10). Обозначения в тексте – WT+PBS.

2 группа – экспериментальная группа мышей C57BL/6 с введением A β 1-42 в CA1 зону гиппокампа (n=10). Обозначения в тексте – WT+A β .

3 группа – *Nlrp3*-нокаутные животные с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в CA1 зону гиппокампа (n=10). Обозначения в тексте – NLRP3 KO+PBS.

4 группа – *Nlrp3*-нокаутные животные с введением A β 1-42 в CA1 зону гиппокампа (n=10). Обозначения в тексте – NLRP3 KO+ A β .

2.3. Введение олигомеров бета-амилоида в головной мозг

Для моделирования болезни Альцгеймера использовали протокол моделирования с введением растворимых олигомерных форм амилоида A β 1-42 в гиппокамп мышей [88]. Недавние исследования свидетельствуют о том, что

растворимые, префибриллярные и олигомерные формы $A\beta$ являются наиболее токсичными [141] и могут влиять на синаптическую пластичность в головном мозге, указывая на то, что эта форма пептида может быть причиной дефицита эпизодической памяти, раннего симптома БА, который связан с патологией гиппокампа [260]. Фактически, растворимые $A\beta$ -олигомеры, также называемые $A\beta$ -производными диффундирующими лигандами, значительно повышаются в головном мозге при БА [104]. Патогенная релевантность этой формы $A\beta$ была подтверждена недавно идентифицированной арктической семейной мутацией при БА, которая имеет повышенную склонность к олигомеризации и данными *in vitro*, демонстрирующими сильную нейротоксичность при воздействии растворимого олигомера или протофибрилл [260]. Более того, ультраструктурная локализация $A\beta$ -олигомера внутри нейрональных процессов и синаптических окончаний в мозге при БА [151], также подтверждает гипотезу о том, что растворимые олигомеры $A\beta$ могут играть решающую роль как самый ранний эффектор, который вызывает синаптическую дисфункцию и раннюю потерю памяти, связанную с деменцией при БА [100]. Следовательно, значительный интерес теперь сосредоточен на понимании нейротоксических механизмов, вызванных растворимыми олигомерами бета-амилоида $A\beta$.

Для введения был использован $A\beta$ 1-42 (Sigma-Aldrich), который растворяли в стерильном 0,1 М PBS (pH 7,4) и получали раствор в концентрации 50uM. Аликвоты хранили при -20°C . $A\beta$ 1-42 подвергали олигомеризации путем инкубации при 37°C в течение 7 дней перед введением [8, 88]. Полученные олигомеры $A\beta$ 1-42 вводили интрагиппокампадно в СА1 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 [8]. Мышь анестезировали внутрибрюшинной инъекцией хлорал гидрата (400 mg/kg) и убеждались в отсутствии реакции на боль, а также роговичного рефлекса. Затем мышь помещали в стереотаксический аппарат (Neurostar, Germany), производили оперативный доступ и оперативный прием. После обнаружения костных ориентиров рассчитывались координаты введения для каждой мыши в соответствии с индивидуальным коэффициентом согласно

стереотаксическому атласу мозга мыши [196]. 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).

2.4. Нейроповеденческое тестирование мышей

Тестирование животных проводилось в светлое время суток в промежутке времени с 09:00 до 12:00 в специальной комнате с постоянной температурой (22°C). Каждый день тестирования начинали с того, что животное адаптировалось к комнате тестирования в течение одного часа.

Каждый день поведенческого тестирования был записан с помощью веб-камеры, подсоединенной к компьютеру с программным обеспечением ANY MAZE software (Stoelting Co., USA).

2.4.1. Тест «Условно-рефлекторного замирания» (*Fear conditioning, FC*)

Тест «Условно-рефлекторного замирания» (FC, далее по тексту) был проведен согласно стандартной методике [231]. 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.

Прибор для тестирования представляет собой акриловую квадратную камеру квадратной формы из акрила (размер 33x25x28 см) с электрифицированным решетчатым полом, которая помещается в звуконепроницаемую камеру (размер 170x210x200 см), чтобы минимизировать

внешние шумы во время тестирования. Подсветка (светоизлучающие диоды 100 люкс) и динамик (условный раздражитель (conditioned stimulus (CS), крепится над испытательной камерой. Решетчатый пол подключен к электрогенератору для подачи электрического сигнала (безусловный раздражитель (unconditioned stimulus (US) (Ugo Basil, Italy) [9].

Для создания условий для замирания в течение первого дня мышей помещали в новую для нее камеру. Мышь могла свободно перемещаться и исследовать камеру в течение 120 секунд. После этого подавали слуховой сигнал (белый шум, 55 дБ), который был представлен в качестве условного раздражителя (CS, conditioned stimulus) в течение 30 секунд, а в качестве безусловного стимула (US, unconditioned stimulus) в течение последних 2 секунд белого шума подавали ток 0,3 мА в. Подачу стимулов CS-US повторяли три раза, чтобы вызвать ассоциацию. Презентация такой комбинации CS-US повторялась три раза за все тестирование на 120, 240 и 360 секунде после начала теста. Мыши оставались в камере в течение 90 секунд после конечного раздражителя, а затем возвращались в домашнюю клетку. Общая продолжительность теста составила 480 сек в первый день. Анализ полученных результатов проводился за каждый выделенный промежуток времени (с 0 по 120 сек, с 120 по 240, с 240 по 360 и с 360 по 480 сек) для отслеживания динамики приобретения ассоциации условного раздражителя с безусловным стимулом.

Контекстный тест (второй день тестирования) проводили через 24 часа после первого теста, когда создавали условия для замирания в той же камере в течение 300 секунд в отсутствие предоставления каких-либо стимулов (без подачи белого шума (CS) и электрического сигнала 0,3 мА (US)).

Сигнальный тест (третий день тестирования) проводился на следующий день после контекстного теста. Этот тест выполнялся в течение 360 секунд в новой контекстной среде. Испытательная камера отличалась от камеры, использованной в первый и второй дни с точки зрения цвета стен, структуры пола (без решетки), и освещенностью 30 люкс, обеспечивая новый контекст, который не связан с камерой, в которой создавали условия для замирания. Тест состоял из

180-секундного периода исследования мышами новой среды, чтобы оценить неспецифический контекстуальный страх, за которым следовал условный стимул на 180 сек (белый шум (CS) без предоставления электрического тока (US)), чтобы оценить приобретенный страх. Процент от продолжительности реакции замирания в каждом временном отрезке был определен как показатель памяти страха, поскольку замирание, как наиболее распространенный элемент в поведении, вызванный сильной болью или страхом, зачастую используется для количественной характеристики в тесте FC [9, 179, 231]. Весь процесс тестирования фиксировался с помощью системы видеоанализа за животными ANY MAZE (Behavior Tracking Software, Stoelting, USA).

2.5. Иммуногистохимическое окрашивание

2.5.1. Подготовка тканей для анализа

Все животные через 30 минут после нейроповеденческого тестирования были глубоко анестезированы с использованием хлоралгидрата. Далее проводили транскардиальную перфузию через восходящую аорту с 20 мл PBS, а затем 20 мл 4% параформальдегида (Sigma, USA), разведенном в 0,1 М фосфатном буфере. Мозги извлекали и фиксировали в том же фиксирующем растворе в течение ночи при 4°C и, затем помещали на 48 ч при 4°C в 20% сахарозу, растворенную в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS, pH 7,4), содержащем 0,01% азид натрия (Sigma, USA). Срезы изготавливали толщиной 50 мкм с помощью вибратома (Thermo Scientific) в саггитальном направлении с использованием стереотаксического атласа для определения локализации миндалевидного тела головного мозга (здесь и далее имеется в виду базолатеральная миндалина, БЛМ).

2.5.2. Проведение иммуногистохимии

Свободно плавающие срезы мозга блокировали в PBS, содержащем 10% нормальной козьей сыворотки (Sigma), 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) и 0,1% азида натрия (Sigma), в течение 1 часа при комнатной температуре.

В первом и втором блоке исследований были использованы следующие антитела и их комбинации: анти-GLUT4 (Abcam, ab654, rabbit monoclonal) 1:1000 и анти-GFAP (Abcam, ab4674, Chicken polyclonal) 1:1000 для оценки экспрессии инсулин-зависимого переносчика глюкозы GLUT4 на GFAP-позитивных астроцитах; анти-GLUT4 (Abcam, ab654, rabbit monoclonal) 1:1000 и анти-NeuN (Merk, ABN90, Guinea Pig polyclonal) 1:1000 для оценки экспрессии GLUT4 на NeuN-позитивных зрелых нейронах; анти-GLUT4 (Abcam, ab654, rabbit monoclonal) 1:1000 и анти-IRAP (Santa cruz, sc-8481, goat monoclonal) 1:1000 для определения колокализации инсулин-зависимого переносчика глюкозы GLUT4 и инсулин-зависимой аминопептидазы IRAP; анти-NLRP3 (Abcam, ab4207, Goat polyclonal) 1:1000 и анти-NeuN (1:1000) (Merk, ABN90, Guinea Pig polyclonal) для оценки экспрессии NLRP3 инфламмасом в зрелых нейронах; анти-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, sc-58766, mouse monoclonal) 1:1000 и анти-NLRP3 (Abcam, ab4207, Goat polyclonal) для оценки экспрессии NLRP3 инфламмасом в астроцитах.

В третьем блоке исследований были проведены иммуногистохимические исследования с использованием следующих антител и их комбинаций: анти-IRS1(phosphor S312) (Abcam, ab66154, rabbit polyclonal) 1:1000 и анти-NeuN (Merk, ABN90, Guinea Pig polyclonal) 1:1000 для оценки экспрессии субстрата инсулинового рецептора, фосфорилированного по серину.

Срезы инкубировали в течение ночи в растворе первичных антител в указанном выше разведении в растворе для первичных антител (PBS, содержащий

10% нормальной козьей сыворотки (Sigma), 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma), 0,2% Triton X-100 (Sigma) и 0,1% азида натрия (Sigma)).

После инкубации с первичными антителами срезы промывали в PBS и затем инкубировали с вторичными антителами Alexa-конъюгированными (1:1000) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки срезы укладывали на предметные стекла и добавляли монтирующую жидкость (FluoroMount, Invitrogen). 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 базолатеральной миндалине головного мозга (БЛМ), определяли количество клеток, одновременно экспрессирующих два исследуемых маркера. В полученных результатах описана экспрессия белка. В некоторых экспериментах определяли интенсивность свечения в пикселях с использованием программы Olympus FluoView software (Ver.4.0a).

2.5.3. Подсчет колокализации экспрессии маркеров

Для определения колокализации в некоторых экспериментах определяли коэффициент перекрытия по Manders. Подсчет вели в поле зрения в базолатеральной миндалине головного мозга.

Коэффициент перекрытия по Manders указывает на перекрытие сигналов и, таким образом, отражает истинную степень колокализации. Значения коэффициента находятся в диапазоне от 0 до 1,0. Если изображение имеет коэффициент перекрытия 0,5, это означает, что 50% двух исследуемых свечений, то есть пикселей, перекрываются. Значение нуля означает, что нет никаких перекрывающихся пикселей [281].

2.6. Окраска с тиофлавином S для детекции олигомеров бета-амилоида

Тиофлавин S представляет собой гомогенную смесь красителей, которая является результатом метилирования дегидротиотолуидина сульфоновой кислотой. Тиофлавин S не избирательно связывает содержимое бета-складчатой структуры белков, таких как амилоидные олигомеры. При связывании тиофлавина S подвергается характерному синему смещению его спектра излучения. И наоборот, связывание тиофлавина S с мономерными формами не вызывает синего сдвига и не может быть обнаружено с помощью флуоресцентного микроскопа. Окрашивание тиофлавином S обеспечивает быструю альтернативу визуализации олигомеров бета-амилоида [166].

Процедуру выполняли на свободно плавающих срезах головного мозга. Срезы помещали в 70% этанол в течение 1 минуты, затем промывали в растворе 80% этанола также в течение 1 минуты. После этого инкубировали срезы в отфильтрованном растворе тиофлавина S (1% в 80% этанола) в течение 15 минут. Затем отмывали срезы вновь в 80% растворе этанола в течение 1 минуты, с последующим помещением срезов в 70% этанол на 1 минуту. После этого срезы головного мозга промывали дважды в дистиллированной воде [166]. Далее перемещали срезы на предметные стекла и наносили монтирующую жидкость (FluoroMount, Invitrogen). Изображения были сделаны с объективом 60× на конфокальном флуоресцентном микроскопе (Olympus FluoView) и обрабатывались с использованием программного обеспечения Olympus FluoView software (Ver.4.0a).

2.7. Иммуноферментный анализ

2.7.1. Определение уровня инсулина

Определение инсулина проводили методом иммуноферментного анализа согласно протоколу, представленному в наборе: Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA 96 tests (80-INSMSU-E01). Для исследования использовали гомогенаты миндалевидного тела, приготовленные на фосфатно-солевом буфере (PBS). В лунки планшета вносили по 5 мкл каждого стандарта, контроля и образцов. Для 5 мкл образца использовали стандарты 0,188, 0,5, 1,25, 3,75 и 6,9 нг / мл и контрольные уровни 2 и 3. Далее проводили шаги согласно протоколу, описанному в инструкции к набору. После окончания последней промывки микропланшет помещали в устройство для считывания («ридер») и проводили измерение при 450 нм. Чувствительность набора составляет 0,115 нг/мл.

Измерение концентрации белков проводили с использованием набора Bio-Rad protein assay kit и с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандартов (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), полученная концентрация белков была представлена в мг/мл. Полученные значения концентрации инсулина в образце в нг/мл делили на концентрацию белков в каждой отдельном образце. Таким образом, результат определения инсулина в гомогенате представляли в нг/мг белка [47].

2.7.2. Определение уровня лактата

Определение лактата проводили методом иммуноферментного анализа согласно протоколу, представленному в наборе: L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (ab65330) [108]. Концентрацию лактата в гомогенатах ткани определяли колориметрическим методом. Для колориметрического анализа

готовили 0,5 мл 1 нмоль/мкл стандарта лактата. Затем используя 1 нмоль/мкл лактата с учетом разведений, готовили стандарты для построения кривой. Образцы ткани промывали в холодном PBS и готовили гомогенаты. Затем центрифугировали в течение 5 минут, после чего собирали супернатант. Использовали 25 мкл образца и доводили объем до 50 мкл с помощью Assay буфера. После стандартных шагов, описанных в инструкции, проводили измерение при 570 нм. Чувствительность набора составляет >0.001 mM.

Концентрация лактата в образце рассчитывали по формуле:

$$Lactate\ Concentration = (La/Sv)D$$

где La = количество лактата по стандартной кривой (нмоль).

Sv = объем образца, добавляемый в лунки (мкл)

D = коэффициент разбавления образца.

Молекулярная масса лактата: 90,08 г / моль.

Измерение концентрации белков проводили с использованием набора Bio-Rad protein assay kit и с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандартов (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), полученная концентрация белков была представлена в мкг/мкл. Полученные значения концентрации лактата в образце в нмоль/мкл делили на концентрацию белков в каждой отдельном образце. Таким образом, результат определения инсулина в гомогенате представляли в нмоль/мкг белка.

2.7.3. Определение уровня интерлейкина 1 бета (IL-1 β)

Определение IL-1 β методом иммуноферментного анализа проводили согласно протоколу, представленному в наборе: IL-1 beta Mouse ELISA Kit 96 tests (KMC0011). Для исследования использовали гомогенаты миндалевидного тела, приготовленные на буфере, содержащем 5 М гуанидин-HCl, разбавленном в 50 mM Трис буфере, pH 8,0 и 1X PBS с ингибитором протеазы 1X. После гомогенаты

промывали в PBS и центрифугировали при 16,000g 20 минут при 4 °C. Перед проведением ИФА гомогенаты тканей разводили стандартным буфером из набора до 1: 100.

Далее проводили серийные разведения стандарта, как описано в схеме разведения в протоколе. Измерение проводили при 450 нм. Минимальная обнаруживаемая концентрация мышинового IL-1 β составляет <7 пг/мл.

Измерение концентрации белков проводили с использованием набора Bio-Rad protein assay kit и с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандартов (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), полученная концентрация белков была представлена в мг/мл. Полученные значения концентрации интерлейкина 1 β в образце в пг/мл делили на концентрацию белков в каждой отдельном образце. Таким образом, результат определения инсулина в гомогенате представляли в пг/мг белка.

2.8. Статистический анализ

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* \times *Операция*), (*Генотип* \times *Стимул*), (*Генотип* \times *Время*), (*Группа* \times *Время*) применяли двуфакторный

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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты нейроповеденческого тестирования «Условно-рефлекторного замирания»

3.1.1. Результаты нейроповеденческого тестирования CD1 мышей с моделированием болезни Альцгеймера

Нейроповеденческое тестирование «Fear conditioning» (FC) используется для оценки ассоциативного обучения и изучения консолидации памяти. Контекстный (второй день тестирования) и сигнальный тест (третий день тестирования) в парадигме «Условно-рефлекторного замирания» позволяют оценить способность запоминать неприятный (условный) стимул и связать его с определенной средой [9]. В контекстном тесте реализуется форма обучения, которая, как правило, считается гиппокамп-зависимой, тогда как в сигнальном тесте, как полагают, осуществляется гиппокамп-независимая форма обучения, ассоциированная, по всей видимости, с миндалиной головного мозга [117, 216].

Замирание, как наиболее очевидная реакция в поведении, вызванном сильной болью или страхом, зачастую используется для количественной характеристики в тесте Fear conditioning [97]. В данном тесте мы оценивали процент времени замирания в течение каждой попытки.

Для сравнения времени замирания в трех группах был использован непараметрический дисперсионный анализ с использованием критерия Краскела-Уоллиса, с последующим множественным сравнением групп с применением критерия Данна. В первый день тестирования, когда подается белый шум (условный раздражитель) и электрический сигнал (безусловный раздражитель), процент времени замирания значимо не отличался у животных

экспериментальной группы с введением бета-амилоида, ложно-оперированных мышей и мышей контрольной группы ($p=0,66$) (Рисунок 7А). Так процент замирания в первый день тестирования у мышей из контрольной группы составил $13,27 \pm 2,18\%$; у ложно-оперированных мышей – $17,61 \pm 3,83\%$ и $18,69 \pm 3,32\%$ у мышей после введения олигомеров бета-амилоида ($p=0,66$).

Во второй день тестирования (контекстный), когда не осуществляется подача белого шума и электрического сигнала, но тестирование происходит в той же камере (контексте), у животных контрольной группы происходит увеличение времени замирания по сравнению с первым днем тестирования (Рисунок 7Б). Это связано с генерализацией страха и предшествующим опытом и является нормальной реакцией мышей [147]. Для анализа полученных данных за два дня тестирования по всем группам был использован двухфакторный ANOVA (для повторяющихся измерений) для выявления значимого влияния двух факторов: *Группы* и *Времени*. Так было отмечено статистически значимое влияние фактора времени – $F(1,47)=18,71$, $p<0,0001$, влияние группы было статистически незначимым $F(2,47)=1,62$, $p=0,2086$. Вместе с тем значимым было влияние взаимосвязи двух факторов $F(2,47)=6,415$, $p=0,0034$. При последующем множественном сравнении групп в первый и второй день было выявлено статистически значимое увеличение времени замирания в группе контрольных мышей во второй день ($29,14 \pm 3,02\%$) по сравнению с первым днем ($13,27 \pm 2,18\%$) ($p=0,0027$, Sidak's критерий), а также схожая динамика наблюдалась в группе с проведением ложной операции – в первый день ($17,61 \pm 3,83\%$) и во второй день – ($31,99 \pm 4,04\%$) ($p=0,0008$, Sidak's критерий). В группе с экспериментальной БА не было выявлено значимого увеличения времени при сравнении времени замирания в первый день ($18,69 \pm 3,32\%$) и второй день ($17,64 \pm 2,45\%$) ($p=0,987$, Sidak's критерий). Таким образом, у мышей экспериментальной группы не происходит формирования ассоциации между условным раздражителем и безусловным стимулом в первый день, что проявляется в неизменяющемся времени замирания в контексте.

Также были выявлены статистически значимые различия во второй день тестирования между исследуемыми группами ($p=0,0054$, Критерий Краскела-Уоллиса) (Рисунок 7В). Был зафиксирован во второй контекстный день статистически достоверно меньший процент замирания у экспериментальной группы после инъекции бета-амилоида ($17,64\pm 2,45\%$) по сравнению с группой контрольных мышей ($29,14\pm 3,02\%$) ($p=0,0387$, множественное сравнение с использованием критерия Данна), а также при сравнении с группой ложного контроля ($31,99\pm 4,04\%$) ($p=0,0106$, критерий Данна). Группы мышей контроля – интактного и с проведением ложной операции статистически не отличались друг от друга ($p>0,99$), что исключает влияние фактора операции.

В третий день тестирования (сигнальный), когда создаются новые условия в испытательной камере (изменение цвета стен и пола) и осуществляется подача белого шума, но без электрического сигнала, было выявлено статистически достоверное различие между исследуемыми группами ($p=0,0007$, Критерий Краскела-Уоллиса) (Рисунок 7Г). При попарном сравнении с использованием критерия Данна выявили статистически значимые различия во времени замирания между группами контрольных интактных животных ($38,59\pm 3,29\%$) и животных с введением бета-амилоида ($27,8\pm 1,48\%$) ($p=0,0253$), а также статистически значимые различия между группой с введением PBS ($40,11\pm 2,39\%$) и инъекцией бета-амилоида ($27,8\pm 1,48\%$) ($p=0,0008$, критерий Данна). Между группой интактного контроля и с ложной операцией существенных различий не выявлено.

Таким образом, инъекция растворимых форм бета-амилоида приводит к нарушениям ассоциативного обучения и запоминания у животных, а именно существенно подавляется процесс консолидации памяти страха.

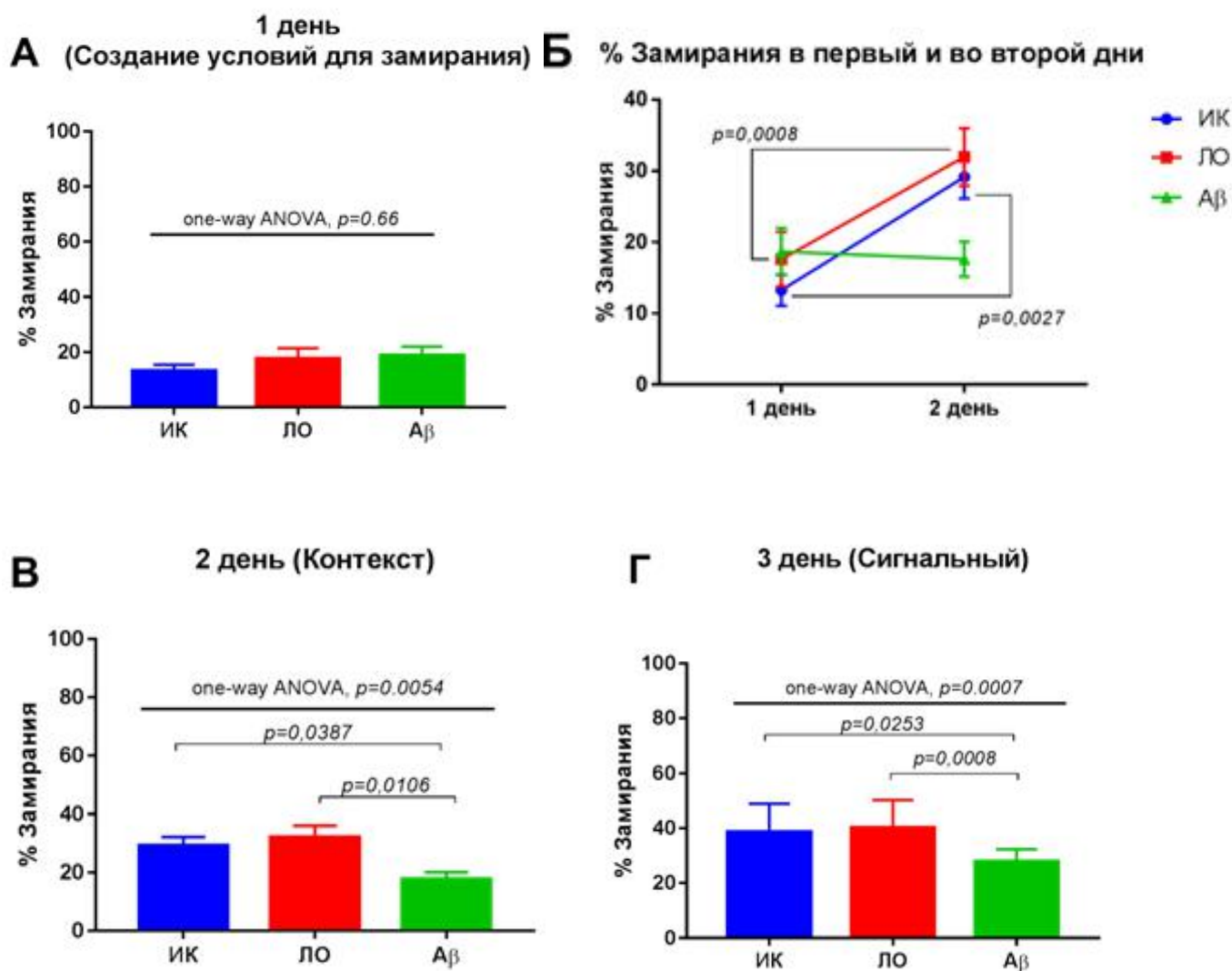


Рисунок 7 – Результаты теста «Условно-рефлекторного замирования». Изменение во времени замирования в разные дни тестирования у мышей с моделированием болезни Альцгеймера. (А) – % замирования в первый день тестирования (создания условий для замирования). Не выявлено статистически значимой разницы между группами ($p=0,66$, Критерий Краскела-Уоллиса). (Б) – Сравнение замирования в первый и второй дни тестирования: увеличение времени замирования в группе контрольных мышей во второй день по сравнению с первым днем ($p=0,0027$, Sidak's критерий); увеличение времени замирования в группе с проведением ложной операции во второй день по сравнению с первым днем ($p=0,0008$, Sidak's критерий). (В) – % замирования во второй день тестирования (контекстный). Статистически значимые отличия между группами ($p=0,0054$, Критерий Краскела-Уоллиса, множественные сравнения с использованием критерия Данна). (Г) – % замирования 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, ЛО – ложная операция, Аβ – инъекция бета-амилоида 1-42.

3.1.2. Результаты нейроповеденческого тестирования *Nlrp3* нокаутных мышей

В данном блоке исследования были изучены особенности формирования памяти и ассоциативного обучения мышей, нокаутных по *Nlrp3*. С данной целью был определен процент замирания в каждый тестируемый день, как это описано в методике. В данном эксперименте оценивали роль NLRP3 инфламмасом в ассоциативном обучении.

В первый опытный день, как уже было описано ранее, мы измеряли процент замирания у мышей. [147]. Интересным и не описанным до этого результатом стало то, что *Nlrp3* нокаутные мыши замирали в каждый день тестирования меньше по сравнению с группой контрольных мышей. В связи с этим было исследовано поведение мышей с течением времени в каждый тестируемый день. Так в первый день мы проанализировали процент замирания мышей до подачи первого стимула CS-US1, что было обозначено как «*Pre-tone*», далее проводился анализ замирания в промежуток предоставляемого стимула CS-US (CS-US1, CS-US2, CS-US3). Поскольку в данном эксперименте добавляется фактор наличия стимула (CS-US), то для анализа мы использовали двухфакторный ANOVA: тест для выявления значимого влияния двух факторов: *Генотипа* и *Стимула*. В первый день тестирования мы отметили статистически значимое влияние генотипа ($F(1,64) = 7,96, p=0,0064$), и предъявляемых с течением времени стимулов ($F(3,64) = 21,59, p<0,0001$). При этом не отметили значимого влияния взаимосвязи двух факторов ($F(3,64) = 1,001, p=0,3983$) (Рисунок 8А). При множественном сравнении групп животных между собой с использованием *post-hoc* Sidak's критерия не выявили различия в проценте замирания у *Nlrp3* нокаутных мышей до предоставления стимула «*Pre-tone*» по сравнению с мышами дикого типа. Такая же тенденция сохраняется и при предоставлении стимулов CS-US1 и CS-US2. Однако мыши, нокаутные по *Nlrp3*, после

предъявления последней пары CS-US3 замирали меньше, что проявлялось сниженным процентом замирания ($32,45 \pm 6,8\%$) по сравнению с группой контроля ($49,97 \pm 2,83\%$), однако данные наблюдения были статистически недостоверными ($p=0,14$). Тем не менее, в данном тесте можно оценить приобретение памяти с течением времени, анализируя изменение времени замирания от предъявления первой пары стимулов CS-US1 и третьей CS-US3 нокаутные. Так показано, что процент замирания у *Nlrp3* нокаутных 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 белым шумом страха. У животных дикого типа наблюдалась следующая динамика данного процесса: процент замирания у WT мышей статистически значимо отличается при сравнении CS-US1 ($25,42 \pm 3,58\%$) и CS-US3 ($49,97 \pm 2,83\%$) ($p=0,0044$, Sidak's критерий). Таким образом, не выявлено нарушений на этапе приобретения памяти у контрольной группы, однако, *Nlrp3* нокаутные мыши имеют некоторые нарушения этапа приобретения памяти.

Во второй день процент замирания оценивали для измерения контекстуальной памяти при отсутствии слуховых стимулов и электрического шока. Поскольку во второй день не было стимулов, то результаты оценивали с течением времени (с первой по пятую минуты). Было отмечено статистически значимое влияние генотипа ($F(1,50) = 36,74$, $p < 0,0001$), и времени ($F(4,50) = 3,95$, $p = 0,0073$). Значимого влияния взаимосвязи двух факторов не выявили ($F(4,50) = 0,2333$, $p = 0,9183$) (двухфакторный ANOVA) (Рисунок 8Б).

На третий день тестирования в условиях новой среды у контрольной группы мышей WT и у *NLRP3*КО мышей фиксировался процент времени замирания до предоставления слухового стимула «Pre-tone» и после предоставления такого стимула «Tone». Было отмечено статистически значимое влияние генотипа ($F(1,20) = 27,23$, $p < 0,0001$), и стимула ($F(1,20) = 15,34$, $p = 0,0009$), при этом не было значимого влияния взаимосвязи этих двух

факторов (двухфакторный ANOVA) (Рисунок 8B). При множественном сравнении выявлено, что 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). Повышенный процент замирания у контрольной группы классически определяется как генерализация контекста (вне зависимости о контекста) [265]. При этом у контрольной группы время замирания увеличивается при предоставлении стимула в виде шума ($84,45 \pm 2,21\%$) по сравнению изначальным временем замирания до предъявления шума ($61,74 \pm 5,31\%$) ($p=0,04$ Sidak's критерий), что свидетельствует о приобретении ассоциативной связи с белым шумом. У группы нокаутных животных такой разницы 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).

В совокупности полученные данные свидетельствуют о наличии частичных нарушений ассоциативного обучения, и запоминания. Это свидетельствует о расстройстве в сфере формирования опосредованной миндалиной эмоциональной памяти.

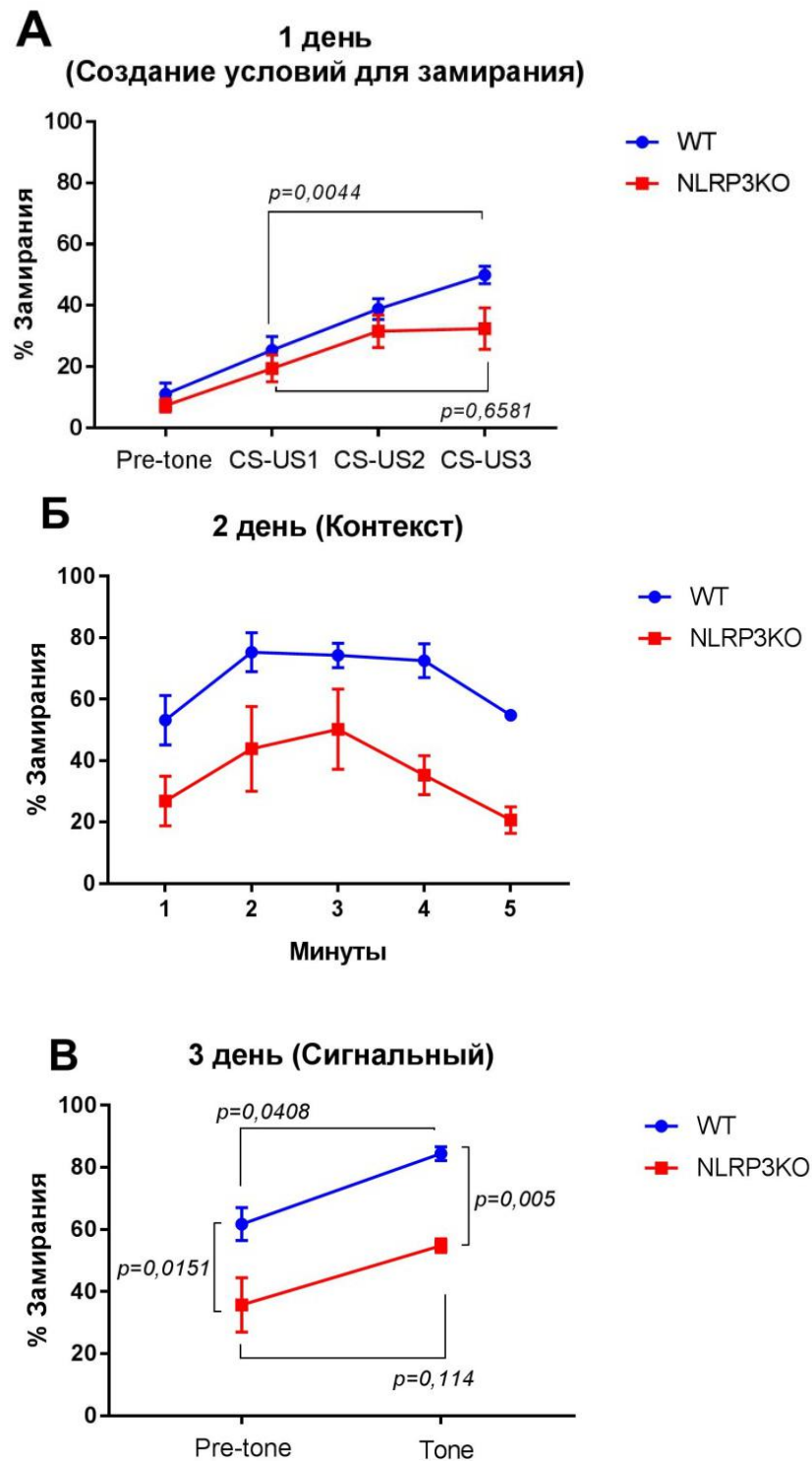


Рисунок 8 – Результаты теста «Условно-рефлекторного замирования». Изменение во времени замирования в разные дни тестирования у *Nlrp3* нокаутных мышей. **(А)** – % замирования в первый день тестирования. Pre-tone – до предъявления стимулов; CS-US1-3 – комбинация условного и безусловного стимула (CS – conditioned stimulus, условный стимул; US – unconditioned stimulus, безусловный стимул). Sidak's критерий. **(Б)** – % замирования во второй день тестирования (контекстный). **(В)** – % замирования в третий день тестирования (сигнальный). Pre-tone – до предъявления условного стимула; Tone – после предъявления условного стимула. Sidak's критерий. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши.

3.1.3. Результаты нейроповеденческого тестирования *NLRP3 KO* мышей с моделированием болезни Альцгеймера

Мы изучали формирование памяти, ассоциированной со страхом (условно-рефлекторной) у мышей *NLRP3KO*, которым с целью моделирования нейродегенерации вводили бета-амилоид интрагиппокампально. С помощью данного эксперимента оценивали роль *NLRP3* инфламмасом при болезни Альцгеймера.

В первый опытный день создания условий для замирания, как уже было описано ранее, мы измеряли процент замирания у мышей. [147]. Поскольку в данном эксперименте добавляется фактор наличия операции (ложная операция или с введением бета-амилоида для моделирования болезни Альцгеймера), то для анализа мы использовали двухфакторный ANOVA тест для выявления влияния двух факторов: генотипа и операции. В первый день тестирования мы отметили статистически значимое влияние генотипа ($F(1,29) = 8,095, p=0,0081$), и операции ($F(1,29) = 5,72, p=0,0235$), не выявлено значимого влияния взаимодействия двух факторов: генотипа и операции ($F(1,29) = 2,85, p=0,1021$) (Рисунок 9А). При последующем множественном сравнении групп животных между собой с использованием Sidak's критерия было выявлено, что мыши дикого типа после проведения ложной операции замирали дольше ($34,52 \pm 2,89\%$) по сравнению с мышами, нокаутными по гену *Nlrp3*, после проведения такой же операции с введением PBS ($22,17 \pm 3,89\%$) ($p=0,0242$, Sidak's критерий). При сравнении мышей одного генотипа с различными операциями выявлено, что введение A β 1-42 контрольным животным приводит к статистически значимому снижению времени замирания ($23,4 \pm 1,38\%$) по сравнению с инъекцией фосфатно-солевого буфера ($34,52 \pm 2,89\%$) ($p=0,048$, Sidak's критерий).

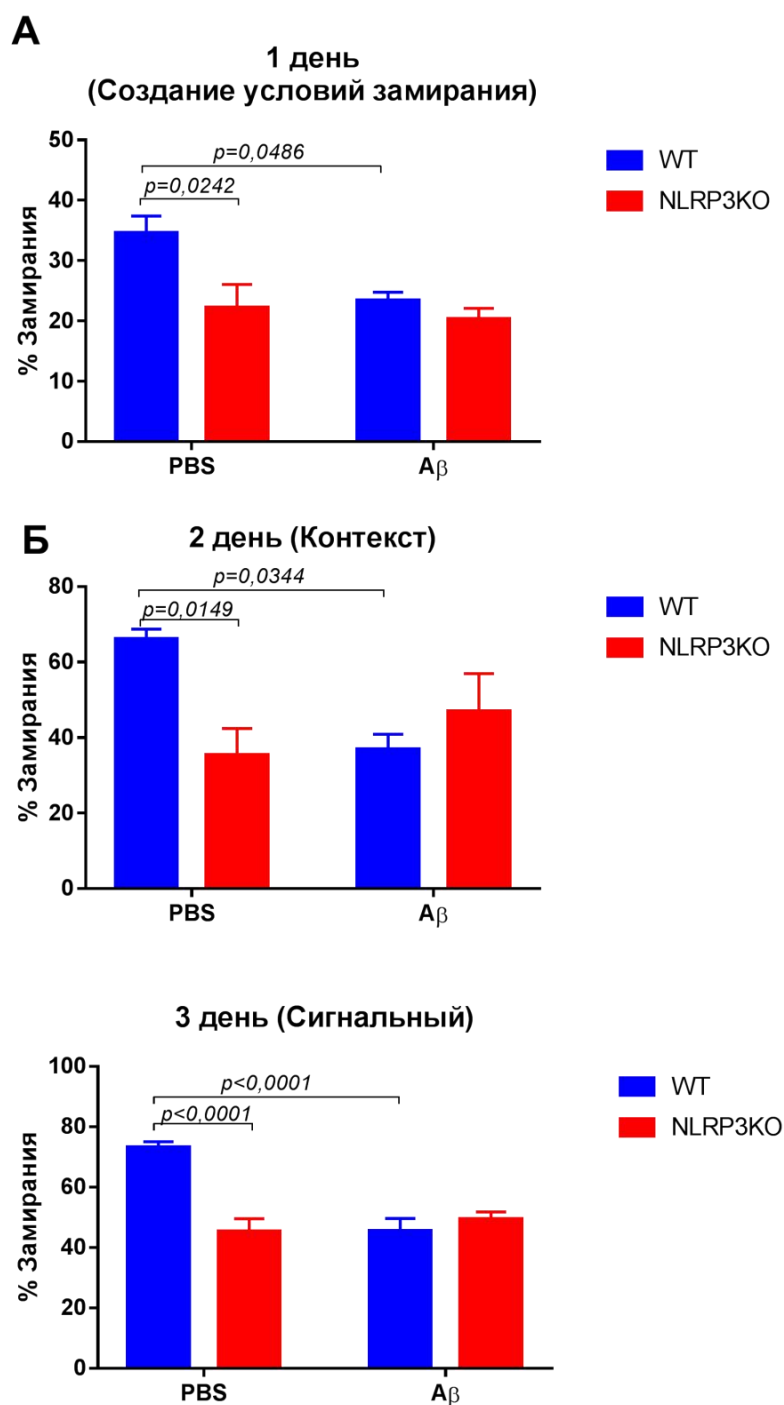


Рисунок 9 – Результаты теста «Условно-рефлекторного замирования». Изменение во времени замирования в разные дни тестирования у *Nlrp3* нокаутных мышей с моделированием болезни Альцгеймера. (А) – % замирования в первый день тестирования (создания условий для замирования). Sidak's критерий. (Б) – % замирования во второй день тестирования (контекстный). Sidak's критерий. (В) – % замирования в третий день тестирования (сигнальный). Sidak's критерий. WT – группа контрольных мышей, 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.

Весьма интересной находкой является то, что у *Nlrp3* нокаутных мышей операция значимого влияния не оказывала и группы не различались между собой по времени замирания ($p=0,9517$, Sidak's критерий).

Во второй день процент времени замирания оценивали для измерения контекстуальной памяти при отсутствии слуховых стимулов и электрического шока. Было отмечено статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (генотипа и операции) в реакции замирания у мышей NLRP3 KO и WT во время тестирования ($F(1,30)=8,631$, $p=0,0063$, двухфакторный ANOVA) (Рисунок 9Б). При проведении множественного сравнения групп было выявлено, что у животных контрольной группы после введения PBS отмечается большее время замирания ($66,01\pm 2,78\%$) по сравнению с *Nlrp3* нокаутными животными после такой операции ($35\pm 7,08\%$) ($p=0,0149$, Sidak's критерий). При этом также статистически значимо отличаются животные контрольной группы при инъекции им олигомеров бета-амилоида ($36,8\pm 4,1\%$) по сравнению с ложной операцией ($66,01\pm 2,78\%$), которые замирают дольше ($p=0,034$, Sidak's критерий). При этом введение бета-амилоида 1-42 в гиппокамп *Nlrp3* нокаутным животным значимо не изменяет процент замирания мышей в FC тесте во второй контекстуальный день ($p=0,6203$, Sidak's критерий).

Классически считается, что в отличие от контекстуального страха, вызванный стимулом (тоном) страх опосредуется именно миндалевидным телом головного мозга, а не гиппокампом [Anagnostaras et al., 1999; Phillips and LeDoux, 1992]. На третий день тестирования при предъявлении стимула в условиях новой среды у контрольной группы мышей WT и у NLRP3KO мышей было зафиксировано замирание в ответ на слуховой стимул в новом контексте. Было отмечено статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (генотипа и операции) у мышей NLRP3 KO и WT с введением бета-амилоида и PBS ($F(1,32)=22,03$, $p<0,0001$), а также каждого фактора по отдельности: влияние операции ($F(1,32)=12,11$, $p=0,0015$), и генотипа ($F(1,32)=12,38$, $p=0,0013$), (Рисунок 9В). Мыши контрольной группы после

введения PBS замирали дольше ($73,1 \pm 1,9\%$) по сравнению с мышами дикого типа после введения A β ($45,39 \pm 4,2\%$) ($p < 0,0001$, Sidak's критерий). Также наблюдали меньшее время замирания после инъекции PBS нокаутным мышам ($45,26 \pm 4,3\%$) по сравнению с введением PBS ($73,1 \pm 1,9\%$) животным дикого типа ($p < 0,0001$, Sidak's критерий).

Таким образом, мыши, нокаутные по гену *Nlrp3* замирают меньше в тесте Fear-conditioning по сравнению с контрольной группой животных. Инъекция бета-амилоида в гиппокамп мышей дикого типа приводит к снижению времени замирания во всех тестируемых днях по сравнению с проведением ложной операции. Инъекции бета-амилоида не имеют статистически значимого влияния на мышей с нокаутированием гена *Nlrp3*.

3.2. Экспрессия маркеров инсулинорезистентности в норме и при болезни Альцгеймера

3.2.1. Результаты инъекции бета-олигомеров 1-42

Поскольку целью текущего эксперимента было изучение изменений на более ранней стадии заболевания БА, внимание было сосредоточено на олигомерных формах A β , которые предположительно отвечают за нейротоксический эффект пептида [258]. В связи с этим мышам вводили олигомерный A β 1-42 пептид в дорзальный гиппокамп (CA1 зону) и тестировали животных, начиная с 7 дня после операции, период времени, в течение которого пептиды могут больше не визуализироваться [90].

Недавнее исследование продемонстрировало, что олигомерные формы бета-амилоида могут быть синаптотоксичными, и свидетельство их осаждения внутри синаптических окончаний вносит значимый вклад в раннюю потерю памяти при болезни Альцгеймера больше, чем образование внеклеточных бляшек A β [255].

При окраске Тиофлавином S идентификации бета-амилоида были обнаружены светящиеся зеленым цветом включения $A\beta$ 1-42 непосредственно рядом с ядром, что указывает на, по всей видимости, внутриклеточную локализацию олигомеров бета-амилоида после проведения моделирования болезни Альцгеймера (Рисунок 10).

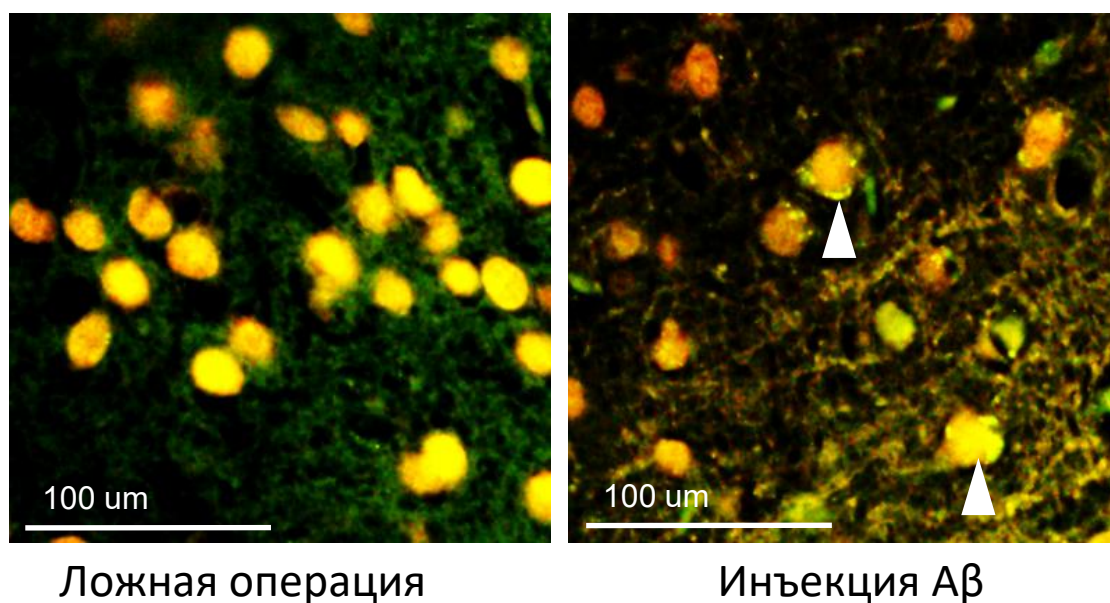


Рисунок 10 – Визуализация флуоресцентного свечения включений бета-амилоида 1-42 в клетках базолатеральной миндалины головного мозга мышей. Окраска тиофлавином S, ядра клеток прокрашены PI. Масштабная шкала 100um.

3.2.2. Результаты определения экспрессии IRAP и GLUT4

Была определена экспрессия IRAP в базолатеральной миндалине головного мозга мышей экспериментальных групп в клетках нейрональной и глиальной природы, а также колокализация этого маркера с GLUT4. Согласно данным литературы, инсулин-зависимая аминопептидаза была идентифицирована в нейронах гиппокампа, а также в других областях мозга,

например, гипоталамусе, гипофизе, коре, обонятельных луковицах, в ядрах лимбической и двигательной систем [91].

IRAP обнаруживается в специализированных везикулах, содержащих чувствительный к инсулину переносчик глюкозы – GLUT4. Обе молекулы транслоцируются из этих пузырьков на клеточную поверхность в ответ на инсулин [91], хотя эта транслокация не гарантирует активность GLUT4, так как везикулы также должны соответствующим образом сливаться с плазматической мембраной [160]. GLUT4 в значительной степени способствует усвоению столь необходимой глюкозы во время реализации когнитивных функций, связанных с памятью [134].

Характеристика клеточной локализации IRAP

Преимущественно нейрональная локализация IRAP была подтверждена с помощью тройной иммуногистохимии с визуализацией маркера нейронов – NeuN (нейрональный ядерный маркер) (Рисунок 11) и маркера астроцитов – GFAP (глиальный кислый фибриллярный белок) (Рисунок 12).

Так в клетках базолатеральной миндалины головного мозга иммунореактивность IRAP была обнаружена в клетках, экспрессирующих NeuN, в клетках, экспрессирующих GFAP, мы также обнаружили иммунореактивность IRAP, что подтверждается коэффициентом перекрытия по Manders.

Таким образом, инсулин-зависимую аминопептидазу в головном мозге экспрессируют как нейроны, так и астроциты. Данная находка является новой и оспаривает ранее полученные данные, в ходе которых было установлено, что в гиппокампе только нейроны способны экспрессировать инсулин-зависимую аминопептидазу. Более того, полученные данные впервые демонстрируют такую экспрессию в базолатеральной миндалине. Например, в клетках мозжечка и клетках обонятельной луковицы IRAP иммунореактивность не совпадает ни с NeuN, ни с GFAP [91].

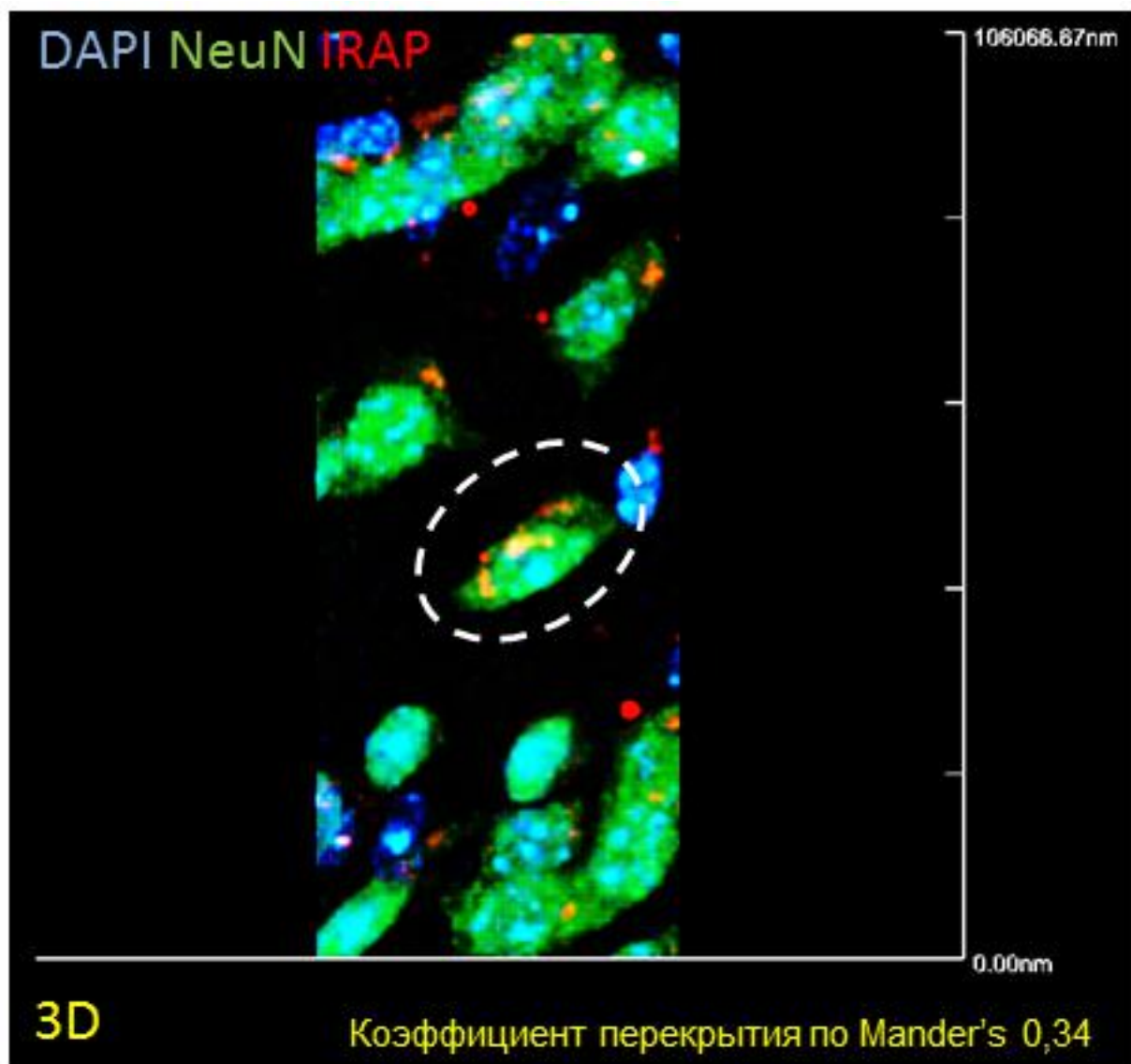


Рисунок 11 – Экспрессия IRAP в зрелых нейронах базолатеральной миндалины головного мозга контрольных животных. Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание. На рисунке представлено наложение трех сигналов: NeuN+клетки (зеленый), IRAP (красный), ядра клеток прокрашены DAPI (синий). Изображение создано при наложении снимков, полученных при воссоздании 3D структуры. Глубина изображения – 106066,87нм. Коэффициент перекрытия по Manders 0,34.

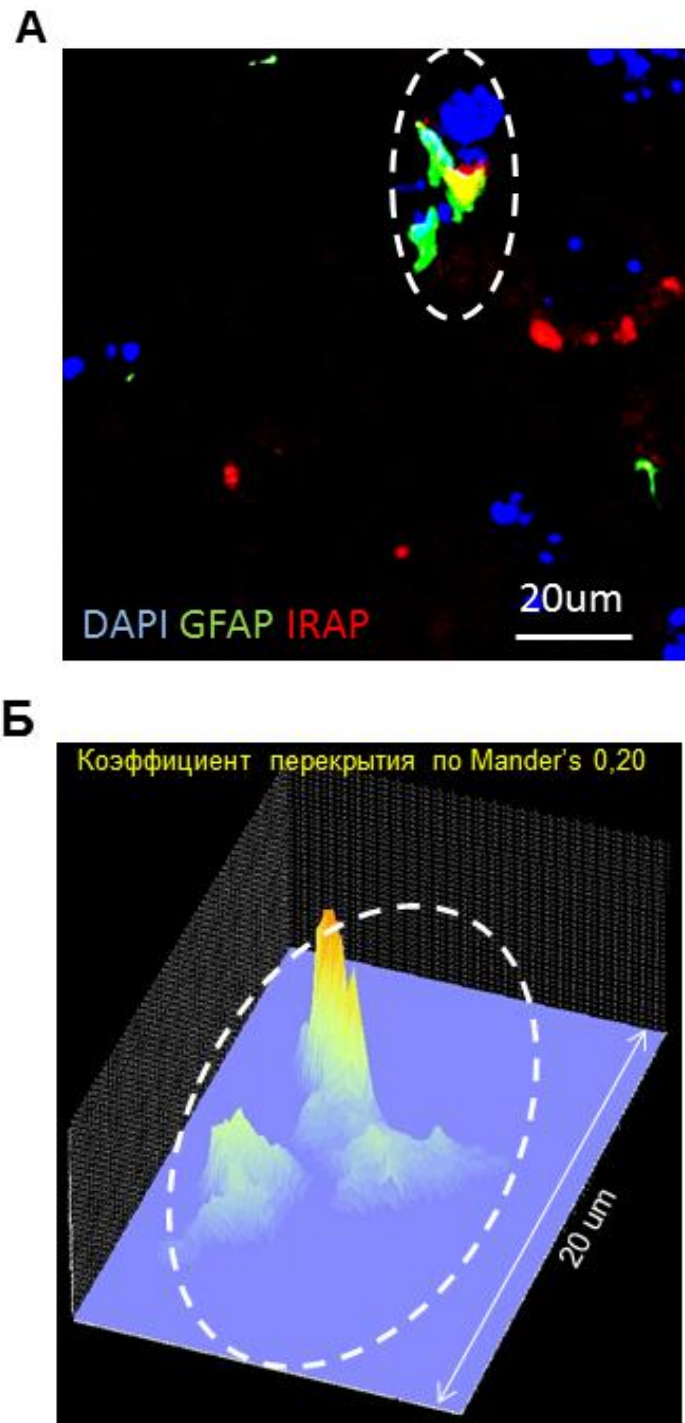


Рисунок 12 – Экспрессия IRAP в астроцитах базолатеральной миндалины головного мозга контрольных животных. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание. На рисунке представлено наложение трех сигналов: GFAP+клетки (зеленый), IRAP (красный), ядра клеток прокрашены DAPI (синий). Масштабная шкала – 20мкм. **(Б) –** Диаграмма перекрытия (колокализации) зеленого (GFAP) и красного (IRAP) каналов регистрируемой флуоресценции. Коэффициент перекрытия по Manders 0,20. Масштабная шкала – 20мкм.

Коэкспрессия IRAP с инсулин-зависимым транспортером глюкозы GLUT4

Внутриклеточная локализация IRAP сравнивалась с клеточной локализацией транспортера глюкозы GLUT4 в БЛМ мозга мышей экспериментальных групп. Репрезентативные изображения показаны из области базолатеральной миндалины (Рисунок 13А-Б). IRAP был локализован в теле клетки и проксимальных отростках нейронов миндалевидного тела. В этих клетках была также визуализирована иммунореактивность GLUT4 по всему телу клетки также с распространением на проксимальные отделы клетки. Это согласуется с предыдущими описаниями колокализации маркеров IRAP и GLUT4 в пирамидальных нейронах гиппокампа [92]. Кроме того, следует отметить высокую степень колокализации маркеров IRAP и GLUT4, что подтверждается коэффициентом перекрытия по Manders (Рисунок 13В).

Сильная степень перекрытия, наблюдаемая между IRAP и GLUT4 в БЛМ, ранее была также отмечена в других областях, включая гиппокамп, медиальную перегородку, обонятельную луковицу и по всей коре головного мозга. Особенно сильная экспрессия GLUT4 отмечалась в первичной и вторичной моторной и соматосенсорной коре в слоях II, III, V и VI. Кроме того, ранее была продемонстрирована выраженная иммунореактивность GLUT4 с IRAP на субклеточном уровне [92].

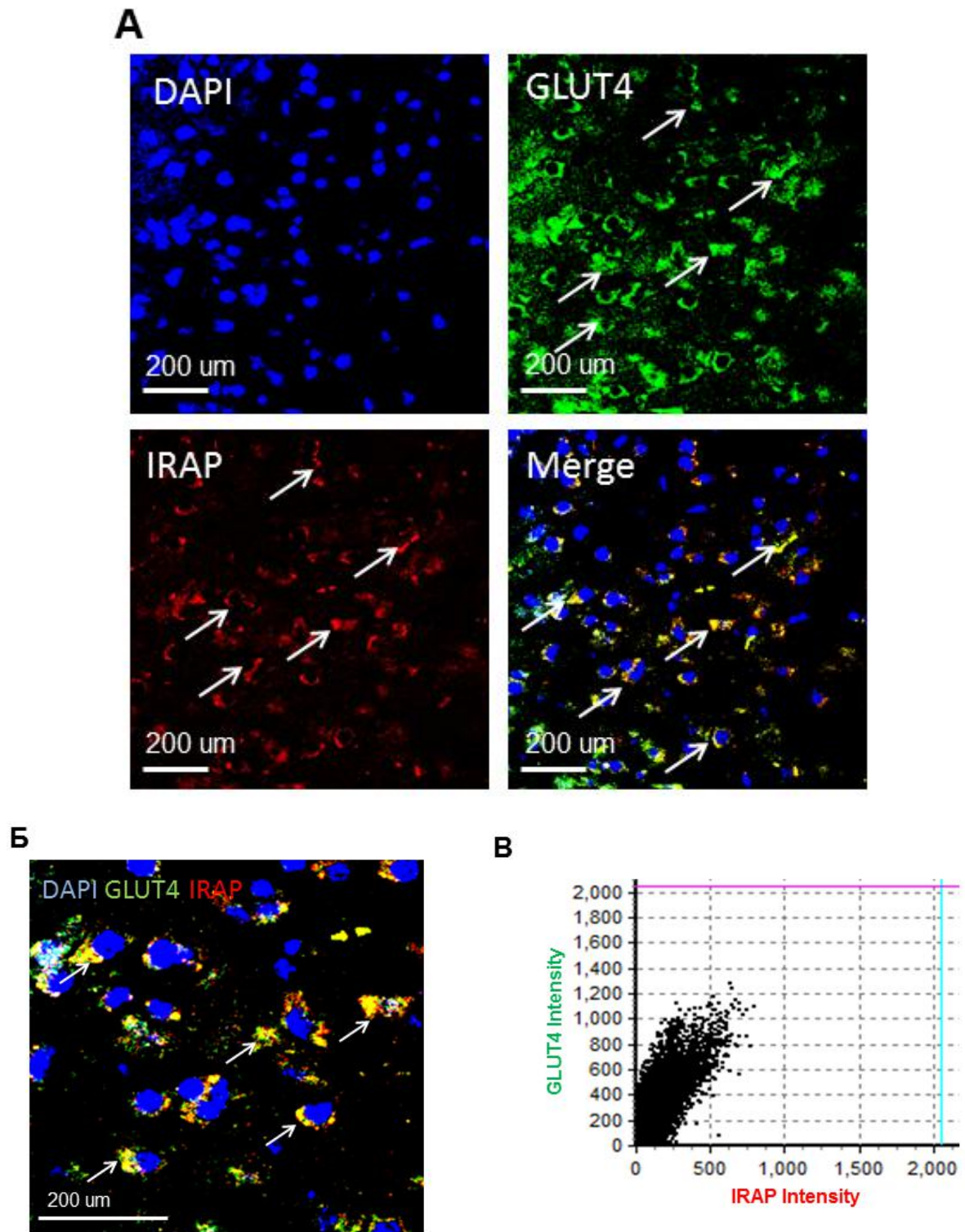


Рисунок 13 – Экспрессия IRAP и GLUT4 в базолатеральной миндалине головного мозга контрольных животных. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия GLUT4 (зеленый), в третьей колонке – экспрессия IRAP (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. **(Б) –** Наложение сигналов при тройном иммунофлуоресцентном окрашивании: ядра клеток DAPI (синий), GLUT4 (зеленый), IRAP (красный). Масштабная шкала – 200мкм. **(В) –** Интенсивность сигнала флуоресценции для изображения, представленного на рисунке (Б). По оси X – интенсивность сигнала IRAP, по оси Y – интенсивность сигнала GLUT4.

Ранее также было показано, что в некоторых областях головного мозга могут проявляться различные степени колокализации IRAP и GLUT4. Например, в боковом ретикулярном ядре некоторые экспрессирующие IRAP нейроны проявляют низкую иммунореактивность GLUT4, но не наоборот, что указывает на то, что в этих областях GLUT4-экспрессирующие нейроны могут представлять собой клетки, содержащие IRAP. Кроме того, в некоторых клетках IRAP и GLUT4 оказались локализованными в отдельных внутриклеточных компартментах. Например, по данным литературы в мозжечке IRAP не был локализован с GLUT4 [92].

В ходе исследования было установлено, что IRAP и GLUT4 были локализованы в тех же везикулах в миндалевидном теле. Степень колокализации между IRAP и GLUT4 в базолатеральной миндалине определяли количественно путем определения коэффициента перекрытия по Manders.

В БЛМ большинство пикселей из объединенного изображения были найдены в направлении середины участка рассеяния, создавая значение коэффициента 0,69, что соответствует очень высокой степени колокализации.

Изменение экспрессии IRAP и GLUT4 при моделировании болезни Альцгеймера

В исследовании была обнаружена высокая коэкспрессия IRAP-инсулин-зависимой аминопептидазы и GLUT4-инсулин-зависимого переносчика глюкозы. Затем изучили экспрессию этих маркеров при экспериментальной БА (Рисунок 14А-В). Так после инъекции олигомеров бета-амилоида выявлено статистически значимое снижение количества клеток, экспрессирующих одновременно IRAP и GLUT4. При экспериментальной болезни Альцгеймера 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) (Рисунок 14В).

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

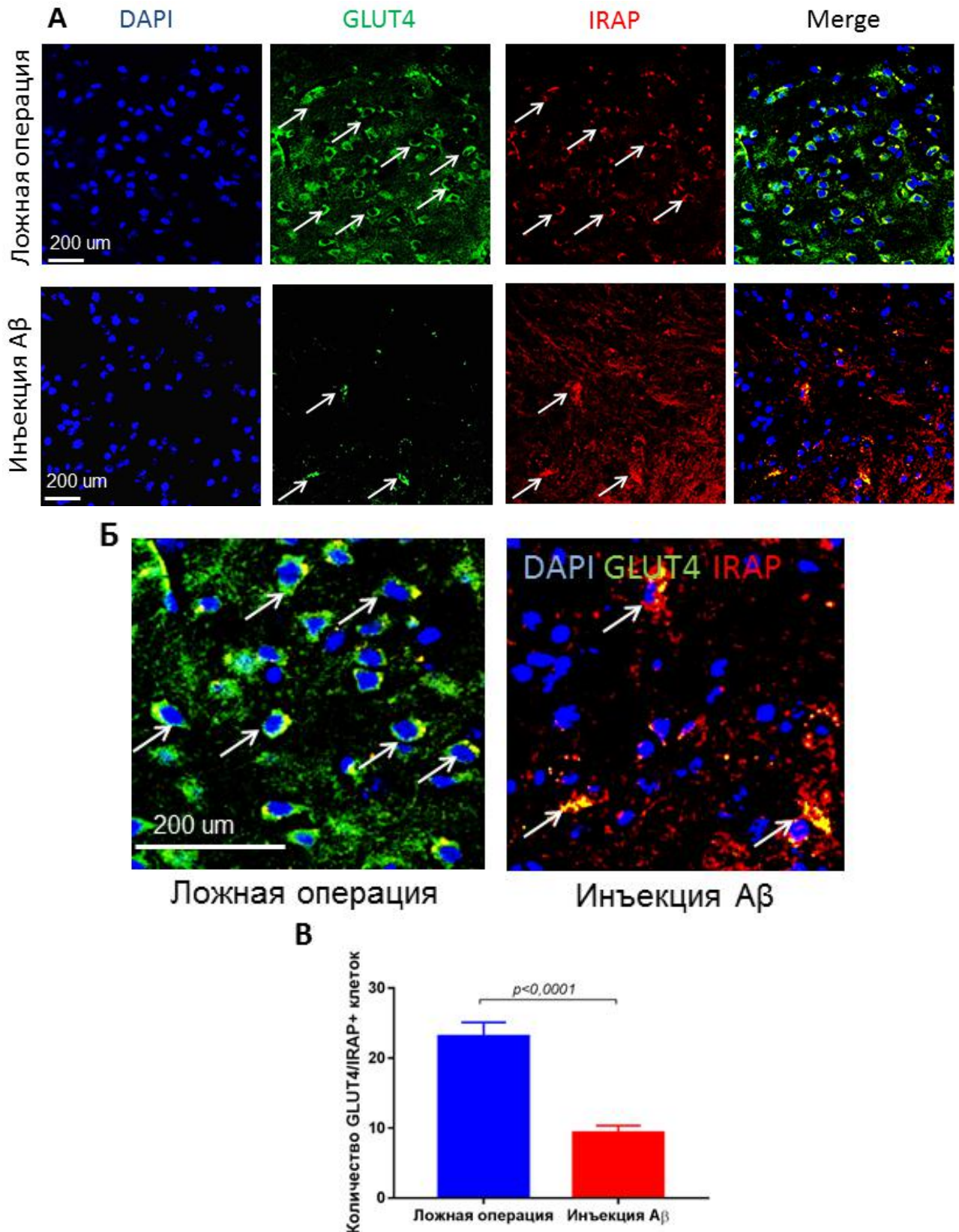


Рисунок 14 – Экспрессия IRAP и GLUT4 в базолатеральной миндалине головного мозга мышей с моделированием болезни Альцгеймера. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй – экспрессия GLUT4 (зеленый), в третьей – экспрессия IRAP (красный), в четвертой представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. (Б) – Наложение сигналов при тройном иммунофлуоресцентном окрашивании: ядра клеток DAPI (синий), GLUT4 (зеленый), IRAP (красный). Масштабная шкала – 200мкм. (В) – Количество GLUT4/IRAP+ клеток. *U* критерий Манна-Уитни.

Увеличение экспрессии IRAP в нейронах и астроцитах при инъекции бета-олигомеров

Кроме того, мы обнаружили, что интенсивность экспрессии IRAP увеличивается как в клетках нейрональной природы, так и в глиальных клетках, экспрессирующих GFAP. Изучая экспрессию IRAP в нейрональных клетках, не было выявлено различий в IRAP/NeuN+ клетках после инъекции A β ($13,47 \pm 4,1$) по сравнению с ложной операцией ($21,75 \pm 3,25$) ($p=0,14$) (U критерий Манна-Уитни) (Рисунок 15А-В). Тем не менее, при определении коэффициента перекрытия по Manders в полях зрения было отмечено, что интенсивность IRAP при моделировании болезни Альцгеймера 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 15Г).

При исследовании количества GFAP+ астроцитов, экспрессирующих инсулин-зависимую аминопептидазу IRAP, определили, что у мышей с инъекцией бета-амилоида также не отмечается статистически значимого 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) (Рисунок 16А-В). Однако, аналогично экспрессии в нейронах, при изучении коэффициента перекрытия по Manders в астроцитах выявили, что он был статистически значимо выше у мышей после инъекции бета-амилоида ($0,38 \pm 0,07$) по сравнению с контрольными мышами ($0,18 \pm 0,06$) ($p=0,0478$) (U критерий Манна-Уитни) (Рисунок 16Г).

Таким образом, в данном исследовании было продемонстрировано, что аккумуляция растворимых олигомеров A β приводит к увеличению интенсивности экспрессии инсулин-зависимой аминопептидазы в нейронах и астроцитах. Ранее в литературе было показано, что болезнь Альцгеймера сопровождается увеличением активности аминопептидаз, но не инсулин-зависимой аминопептидазы [102].

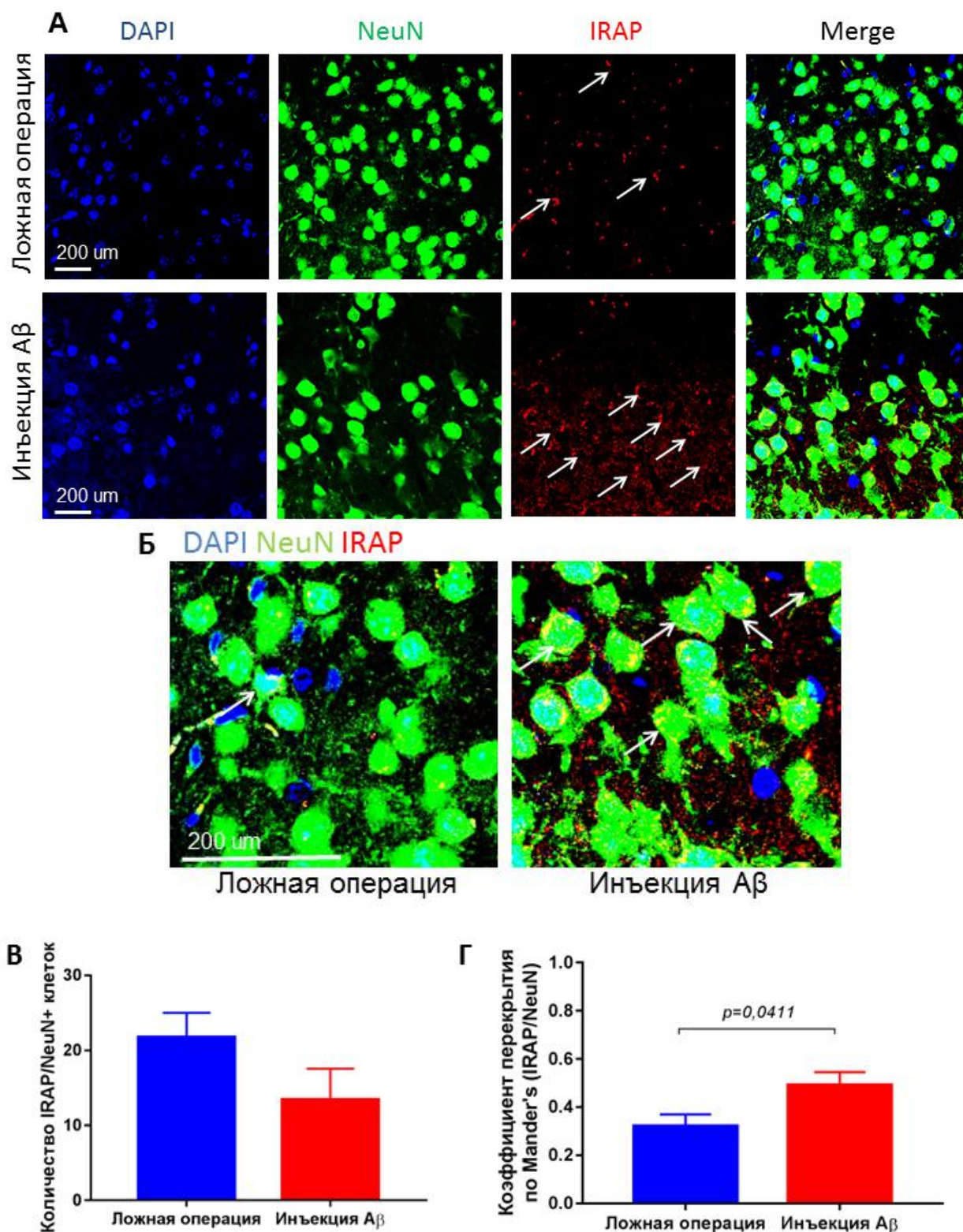


Рисунок 15 – Экспрессия IRAP в нейронах базолатеральной миндалины мышей с моделированием болезни Альцгеймера. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия NeuN (зеленый), экспрессия IRAP (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. **(Б) –** Наложение сигналов: ядра клеток DAPI (синий), NeuN (зеленый), IRAP (красный). Масштабная шкала – 200мкм. **(В) –** Количество IRAP/NeuN+ клеток. *U* критерий Манна-Уитни. **(Г) –** Коэффициент перекрытия сигналов по Manders; *U* критерий Манна-Уитни

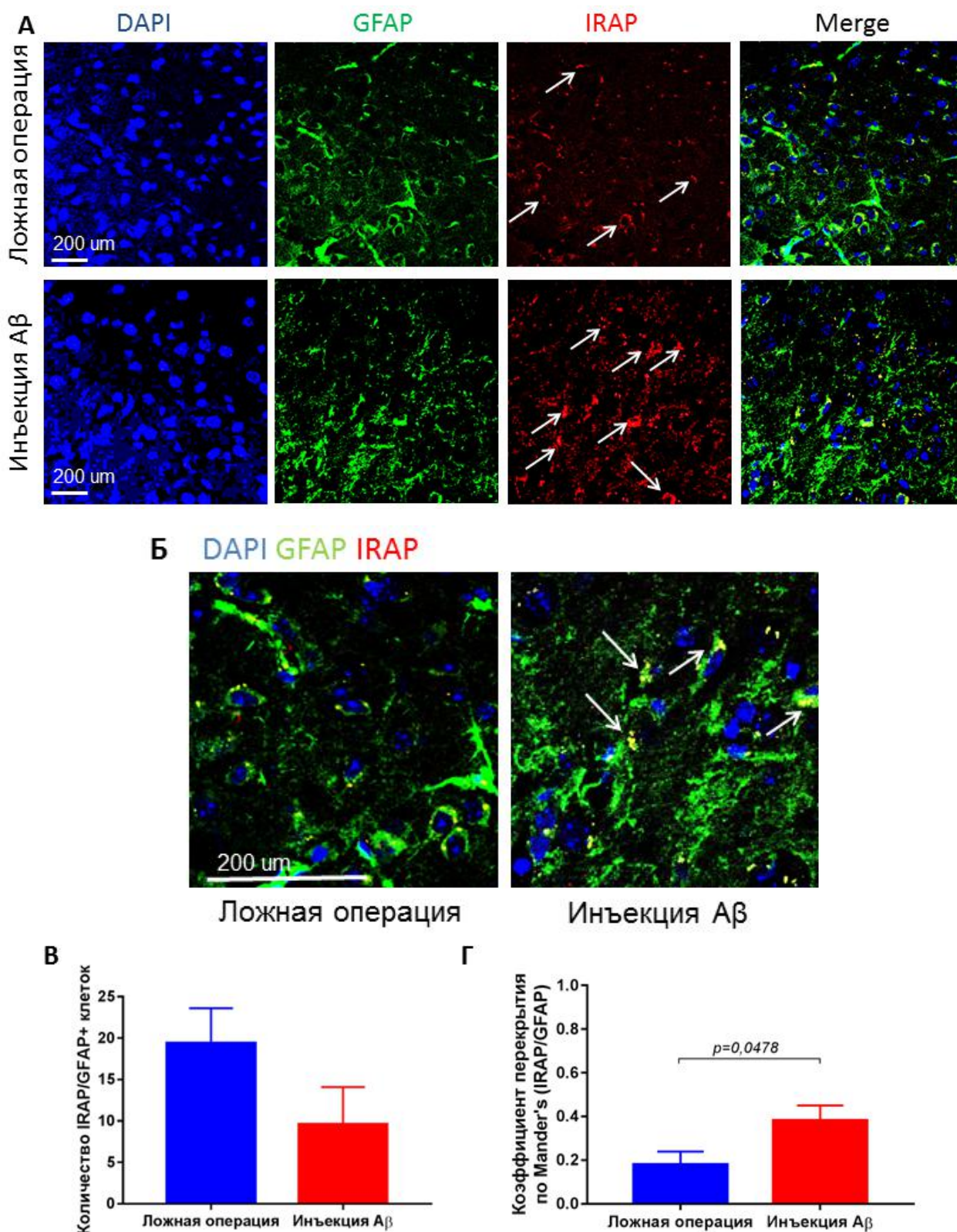


Рисунок 16 – Экспрессия IRAP в астроцитах базолатеральной миндалины головного мозга мышей с моделированием болезни Альцгеймера. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия GFAP (зеленый), экспрессия IRAP (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. (Б) – Наложение сигналов: ядра клеток DAPI (синий), GFAP (зеленый), IRAP (красный). Масштабная шкала – 200мкм. (В) – Количество GFAP/NeuN+ клеток. (Г) – Коэффициент перекрытия сигналов по Manders; *U* критерий Манна-Уитни.

3.3. Экспрессия NLRP3 инфламмасом в клетках нейрональной природы в норме и при болезни Альцгеймера

Изучение процесса формирования инфламмасом требует более тщательного внимания. В последние годы стали появляться сообщения о формировании инфламмасом [87].

В текущем эксперименте оценили экспрессию NLRP3 инфламмасом в зрелых нейронах. При иммуногистохимическом исследовании выявили, что инъекция бета-амилоида приводит к увеличению количества зрелых нейронов, колокализованных с NLRP3, в БЛМ 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).

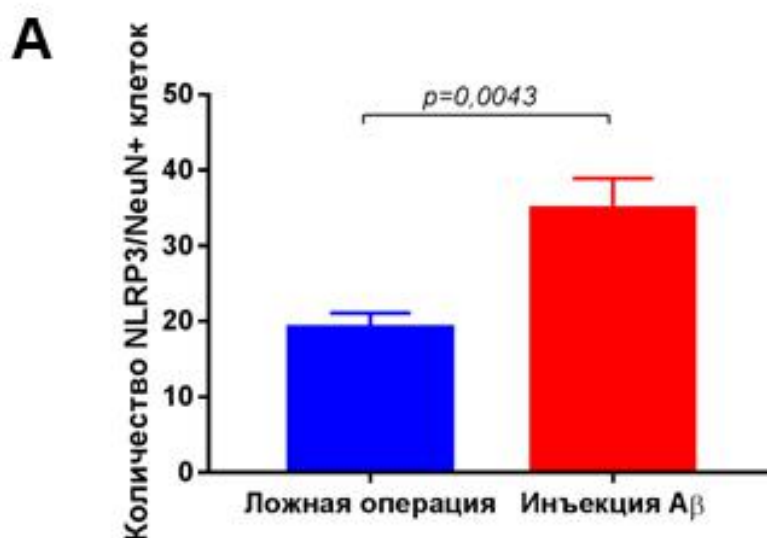


Рисунок 17 (А) – Количество NLRP3/NeuN+ клеток в поле зрения в базолатеральной миндалине головного мозга. (U критерий Манна-Уитни).

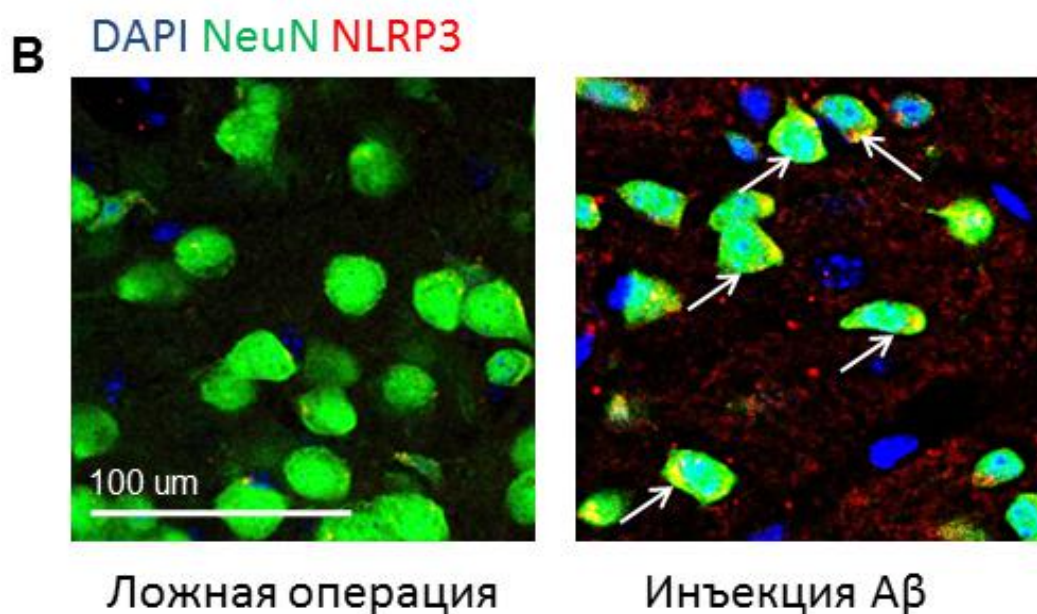
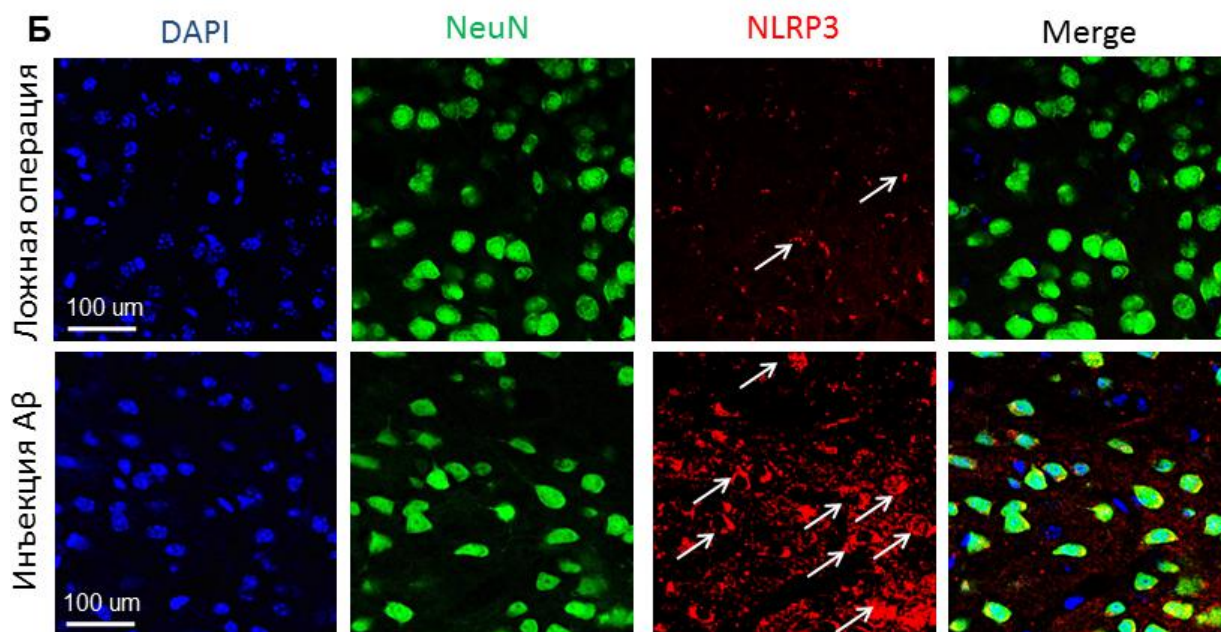


Рисунок 17 – Экспрессия NLRP3 в зрелых нейронах базолатеральной миндалины головного мозга мышей при моделировании болезни Альцгеймера. (Б) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия NeuN (зеленый), экспрессия NLRP3 (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100мкм. (В) – Наложение сигналов при тройном иммунофлуоресцентном окрашивании: ядра клеток DAPI (синий), NeuN (зеленый), NLRP3 (красный). Масштабная шкала – 100мкм.

3.4. Экспрессия маркера глиальных клеток и маркеров инсулинорезистентности у NLRP3 нокаутных мышей

3.4.1. Сокращение количества астроцитов и изменение их морфологии в мозге NLRP3 нокаутных мышей

При выполнении иммуногистохимии с использованием анти-GFAP-антител и конфокальной микроскопии наблюдалось снижение количества астроцитов у NLRP3 КО мышей (Рисунок 18). Было подсчитано количество GFAP+ клеток в базалатеральной миндалине. Количественный анализ, проведенный на срезах мозга у семи NLRP3 КО и семи контрольных мышей, соответствующих по возрасту, показал значительное снижение астроцитов в базалатеральной амигдале – снижение положительных клеток GFAP ($184,8 \pm 11,54$ клеток/мм² в базолатеральной миндалине NLRP3 КО мышей и $418,3 \pm 20,34$ клеток / мм² 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 КО группе по сравнению с контрольными мышами. Длина отростков в астроцитах у NLRP3 КО мышей также была короче по сравнению с контрольными мышами дикого типа.

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 [26].

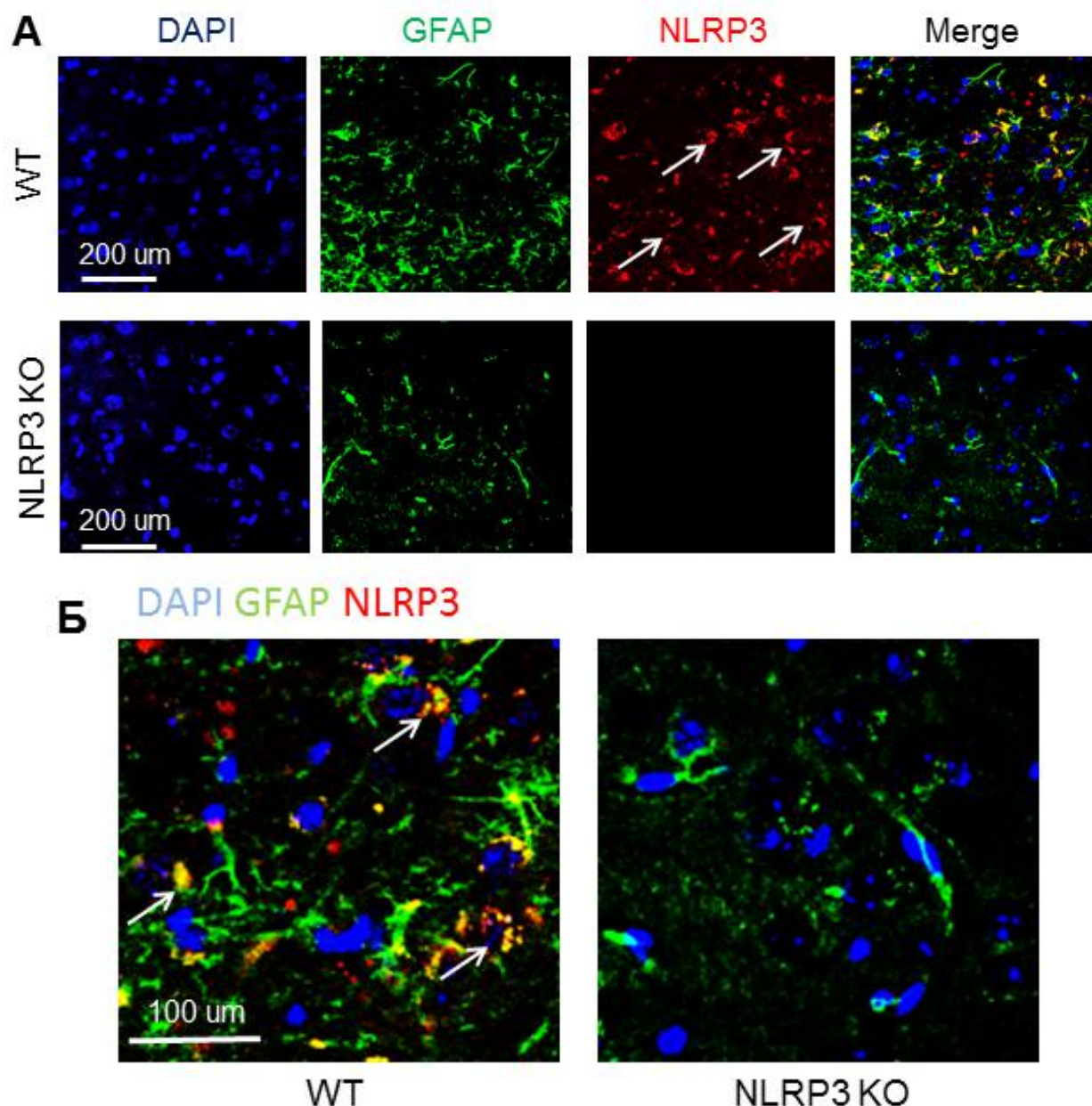


Рисунок 18 – Экспрессия NLRP3 инфламмасом в базолатеральной миндалины головного мозга мышей. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия GFAP (зеленый), экспрессия NLRP3 (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. (Б) – Наложение сигналов при тройном иммунофлуоресцентном окрашивании: ядра клеток DAPI (синий), GFAP (зеленый), NLRP3 (красный). Масштабная шкала – 100мкм. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши.

3.4.2. Паттерн экспрессии IRAP и GLUT4 у *Nlrp3* нокаутных мышей

Поскольку, как уже было описано в обзоре литературы, нейровоспаление является общей чертой многих нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, мы решили оценить экспрессию маркеров GLUT4 и IRAP у животных, которые не экспрессируют NLRP3 инфламмосомы, чтобы оценить вклад нейровоспаления в развитие инсулинорезистентности.

Так как транслокация GLUT4 в мембрану клетки обеспечивается активностью IRAP [273], поэтому отсутствие экспрессии IRAP может привести к снижению экспрессии GLUT4 [138]. Кроме того, в последние годы IRAP рассматривается как один из маркеров инсулинорезистентности при БА, однако его механизм действия является предметом активных исследований ученых [272].

Анализ колокализации маркеров GLUT4/IRAP проводили в БЛМ. Полученные данные указывают на снижение количества 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 19).

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 20).

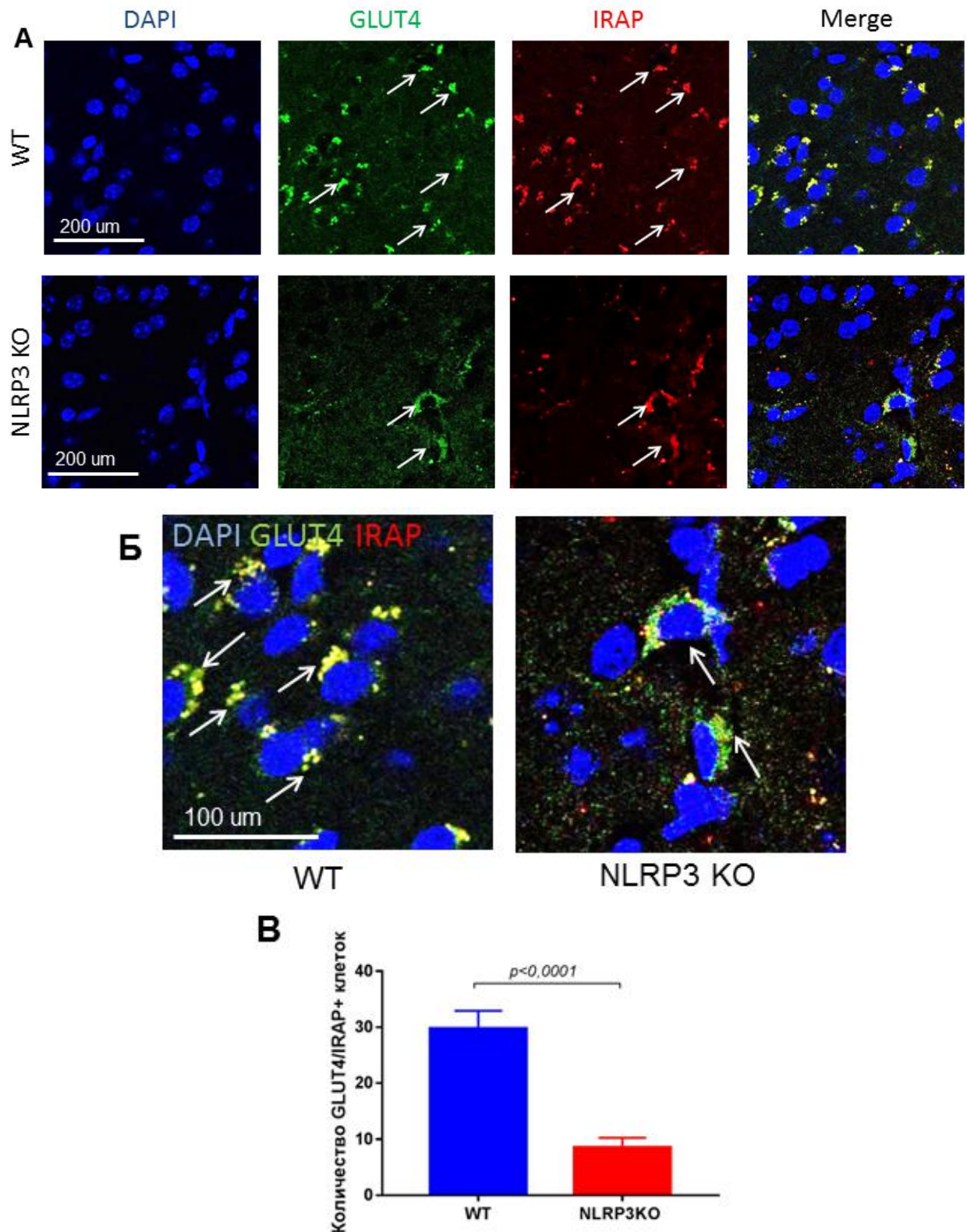


Рисунок 19 – Экспрессия IRAP и GLUT4 в базолатеральной миндалине головного мозга мышей. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия GLUT4 (зеленый), экспрессия IRAP (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. **(Б)** – Наложение сигналов при тройном иммунофлуоресцентном окрашивании: ядра клеток DAPI (синий), GLUT4 (зеленый), IRAP (красный). Масштабная шкала – 100мкм. **(В)** – Количество GLUT4/IRAP+ клеток. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. (*U* критерий Манна-Уитни).

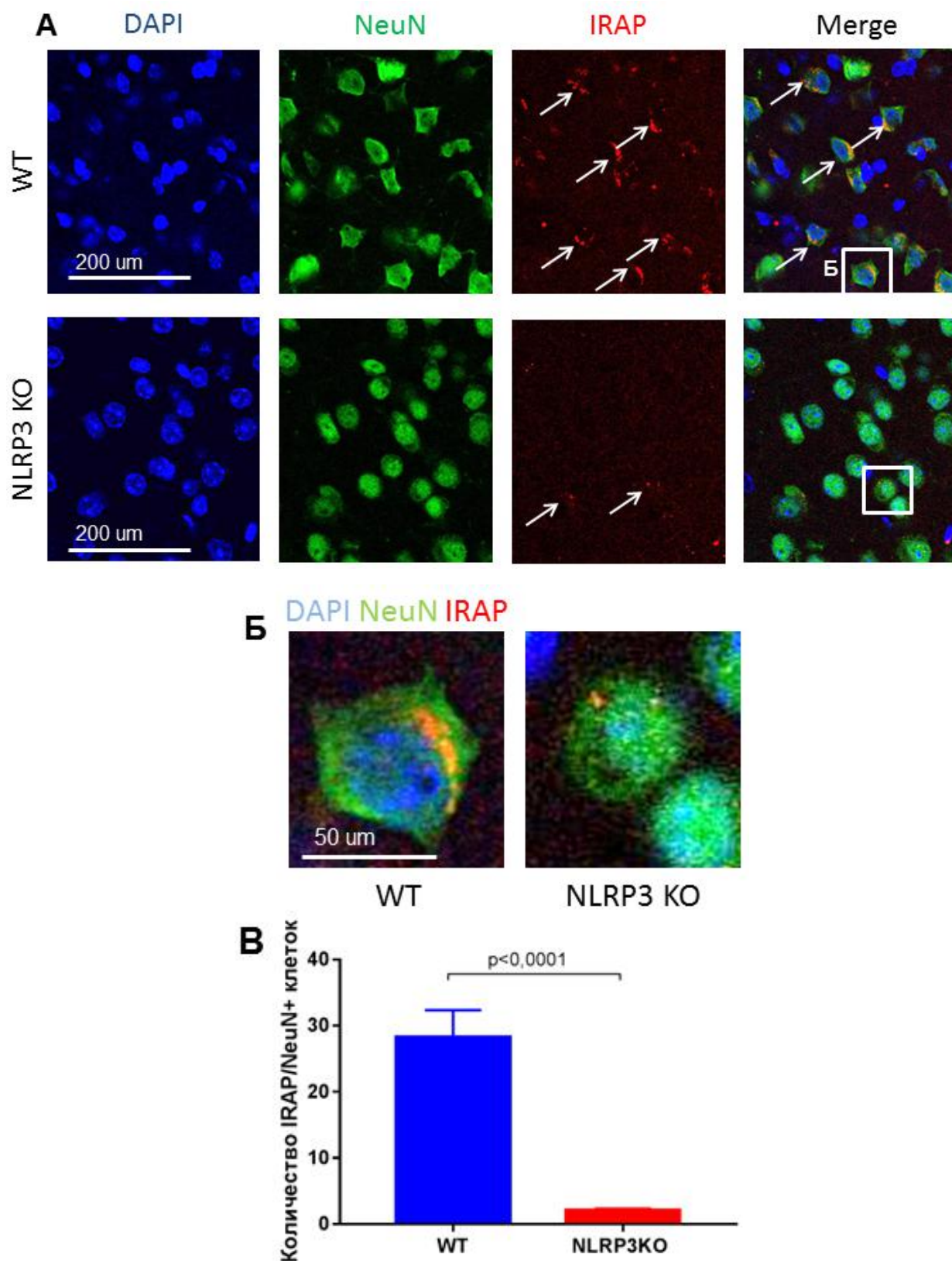


Рисунок 20 – Экспрессия IRAP в зрелых нейронах базолатеральной миндалины головного мозга мышей. (A) – Тройное иммуофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), NeuN (зеленый), IRAP (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. (Б) – Наложение сигналов: ядра клеток DAPI (синий), NeuN (зеленый), IRAP (красный). (В) – Количество IRAP/NeuN+ клеток. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. (*U* критерий Манна-Уитни).

В GFAP-позитивных астроцитах было отмечено значимое снижение экспрессии IRAP в группе *Nlrp3* нокаутных мышей ($2,64 \pm 0,35$ клеток) по сравнению с мышами контрольной группы ($13,6 \pm 2,16$) ($p=0,0003$, *U* критерий Манна-Уитни) (Рисунок 21).

Таким образом, изучение особенностей экспрессии маркера инсулин-зависимой аминопептидазы IRAP в головном мозге *Nlrp3* нокаутных мышей продемонстрировало значимое снижение этого маркера в клетках глиальной и нейрональной природы по сравнению с мышами дикого типа. Также отметили и снижение экспрессии маркера инсулин-зависимого глюкозного транспортера GLUT4 в базолатеральной миндалине головного мозга.

Вместе с тем, литературные данные указывают на то, что IRAP играет значительную роль в постнатальном развитии мозга и нормальном функционировании гиппокампа во взрослом возрасте [272].

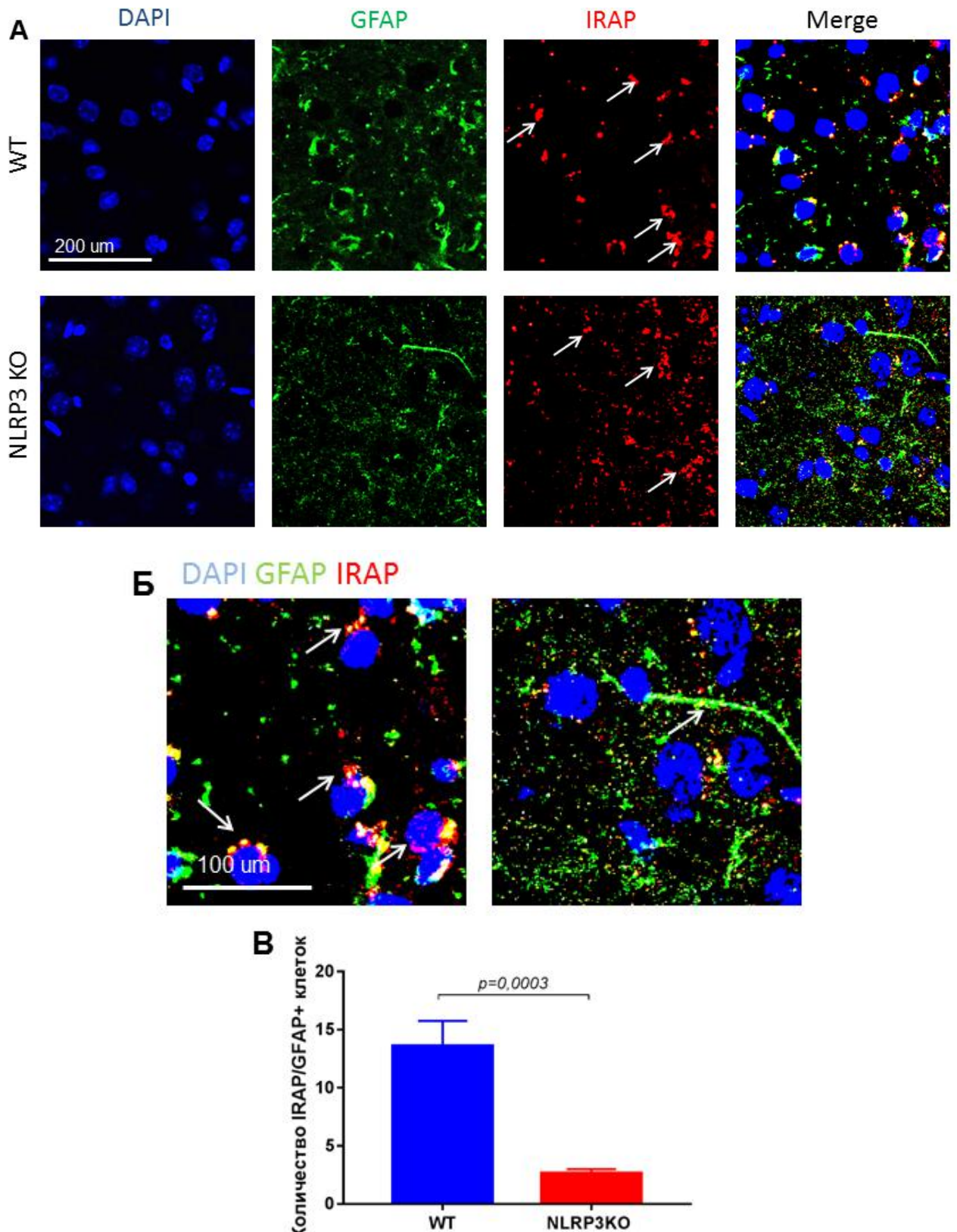


Рисунок 21 – Экспрессия IRAP в астроцитах базолатеральной миндалины головного мозга мышей. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия GFAP (зеленый), экспрессия IRAP (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. (Б) – Наложение сигналов: ядра клеток DAPI (синий), GFAP (зеленый), IRAP (красный). Масштабная шкала – 100мкм. (В) – Количество IRAP/GFAP+ клеток. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. (U критерий Манна-Уитни).

3.5. Экспрессия субстрата инсулинового рецептора, фосфорилированного по серину (pIRS-Ser), у *Nlrp3* нокаутных мышей с инъекцией бета-амилоида A β 1-42

Исследование проводили в контрольной группе с выполнением ложной операции (WT+PBS), при моделировании болезни Альцгеймера у животных дикого типа (WT+A β), у *Nlrp3*–нокаутных животных с ложной операцией (NLRP3KO+PBS) и у нокаутных мышей по *Nlrp3* с введением бета-амилоида (NLRP3KO+ A β).

Мы определили коэффициент колокализации с помощью программы Fluoview Olympus. Поскольку в данном блоке экспериментов помимо разного генотипа мышей, добавляется фактор операции (введение бета-амилоида или проведения ложной операции), поэтому был использован для анализа метод двухфакторный ANOVA. Полученные результаты свидетельствуют о статистически значимом влиянии 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 ($F(1,16)=5,81$, $p=0,028$). При последующем множественном сравнении коэффициентов перекрытия по Mander's были получены следующие результаты: так, в группе контрольных животных с введением фосфатно-солевого буфера (PBS) коэффициент перекрытия был низким и составил $0,24\pm0,17$; при введении в головной мозг животным дикого типа бета-амилоида экспрессия нейронами субстрата инсулинового рецептора, фосфорилированного по серину значительно увеличивается (Рисунок 22А-Б) и коэффициент перекрытия составил $0,87\pm0,15$ ($p<0,0001$, Sidak's критерий). Весьма интересной находкой является то, что экспрессия IRS зрелыми нейронами у животных с делецией *Nlrp3* вне зависимости от введения бета-олигомеров не изменяется. Так, у нокаутных *Nlrp3* мышей при моделировании болезни Альцгеймера выявлен следующий коэффициент

перекрытия ($0,42 \pm 0,18$), при введении нокаутным животных растворителя ($0,36 \pm 0,1$) (ложная операция) ($p > 0,05$, Sidak's критерий).

Таким образом, можно предположить, что делеция инфламмасом 3 (NLRP3) имеет протекторное значение при развитии болезни Альцгеймера или умеренных когнитивных нарушений, сопровождаемых инсулинорезистентностью, за счет сниженной экспрессии pIRS-Ser.

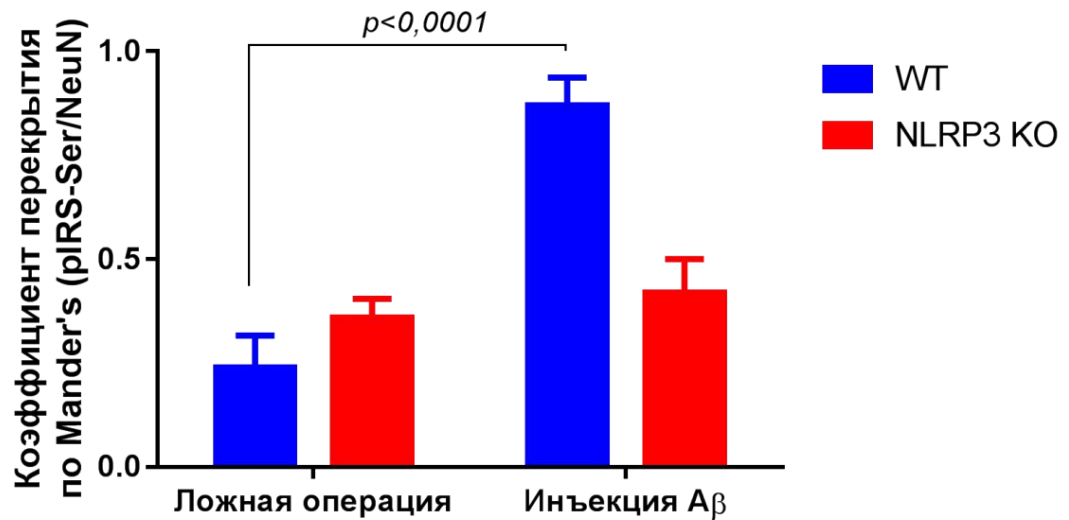


Рисунок 22 (А) – Коэффициент перекрытия по Manders (pIRS-Ser/NeuN) в исследуемых группах. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. Двухфакторный ANOVA с последующим множественным сравнением с помощью критерия Sidak's.

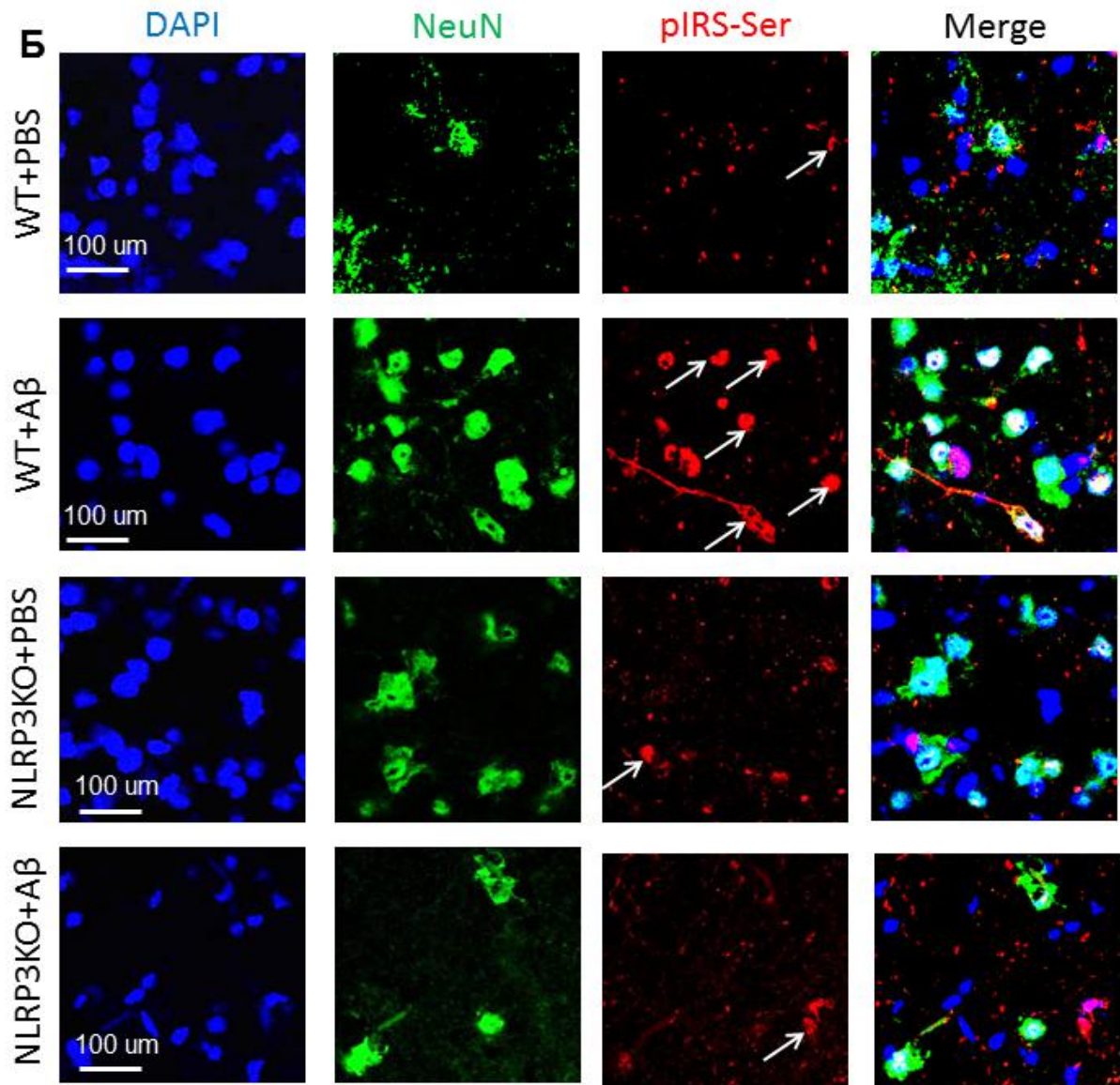


Рисунок 22 (Б) – Экспрессия pIRS-Ser в зрелых нейронах базолатеральной миндалины головного мозга при моделировании болезни Альцгеймера. Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия NeuN (зеленый), экспрессия pIRS-Ser (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100мкм. WT+PBS – группа контрольных мышей с ложной операцией, WT+Aβ – группа контрольных мышей с введением бета-амилоида 1-42, NLRP3KO+PBS – *Nlrp3* нокаутные мыши с ложной операцией, NLRP3KO+ Aβ – *Nlrp3* нокаутные мыши с введением бета-амилоида 1-42.

Известно, что наибольшее значение для передачи инсулинового сигнала имеют IRS-белки [28]. На сегодняшний день изучены несколько изоформ, среди которых ключевую роль играют IRS-1 и IRS-2. Так, белок IRS-2 ответственен за центральные эффекты инсулина, включая контроль роста и дифференцировки нейрональных клеток, центральную регуляцию пищевого поведения, глюкозного гомеостаза и эндокринных функций белки [28]. Исследования показали, что повышенное фосфорилирование IRS1 по остаткам серина, приводит к невозможности передачи сигналов вторичным мессенджерам, таким, как PI3K. Это оказывает влияние на другие патологические процессы в ткани головного мозга, включая фосфорилирование тау и нейровоспаление. Передача сигналов PI3K / Akt может опосредовать ряд нисходящих путей, включая путь Wnt / β -catenin, сигнализацию mTOR и регулирование активности GSK3 β [14, 256].

Таким образом, увеличение экспрессии aberrantly фосфорилированного субстрата инсулинового рецептора в нейронах определяет формирование локальной инсулинорезистентности при экспериментальной нейродегенерации.

3.6. Результаты определения лактата, инсулина и IL-1 β

3.6.1. Результаты определения лактата

Еще в начале 1990-х годов было показано, что для консолидации памяти необходим процесс гликогенолиза с образованием лактата [107]. Учитывая доказательства, идентифицирующие астроциты как основные производители лактата, была предположена возможная роль переноса лактата из астроцитов в нейроны в процессах консолидации памяти [167].

Аналогично показано, что лактат необходим для консолидации памяти в других задачах обучения у грызунов, включая пространственную рабочую память [187] и тест на определение предпочтения кокаина (поведение, связанное с базалатеральной миндалиной) [58, 60, 279]. Недавно было показано, что L-лактат, продуцируемый астроцитами, облегчает синхронизацию миндалины с передней корой и участвует в принятии решений [261].

В связи с этим мы исследовали концентрацию продукта метаболизма глюкозы — лактата в миндалевидном теле животных методом иммуноферментного анализа. Так мы определили базальный уровень лактата у животных контрольной группы и у *Nlrp3* нокаутных мышей (Рисунок 23). 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. При множественном сравнении выявлено, что уровень лактата в миндалевидном теле у животных дикого типа и нокаутных по *Nlrp3* после ложной операции не отличается ($23,02 \pm 3,68$, и $23,4 \pm 6,79$ нмоль/мкг белка, соответственно, $p=0,9999$, Sidak's критерий). При этом моделирование БА

посредством инъекции бета-амилоида не вызывает достоверного изменения лактата у *Nlrp3* нокаутных мышей ($23,375 \pm 5,34$ нмоль/мкг белка) и у мышей дикого типа ($22,37 \pm 8,78$ нмоль/мкг белка) ($p > 0,9999$, Sidak's критерий).

Таким образом, не отмечено различий в концентрации лактата в миндалевидном теле головного мозга в исследуемых группах.

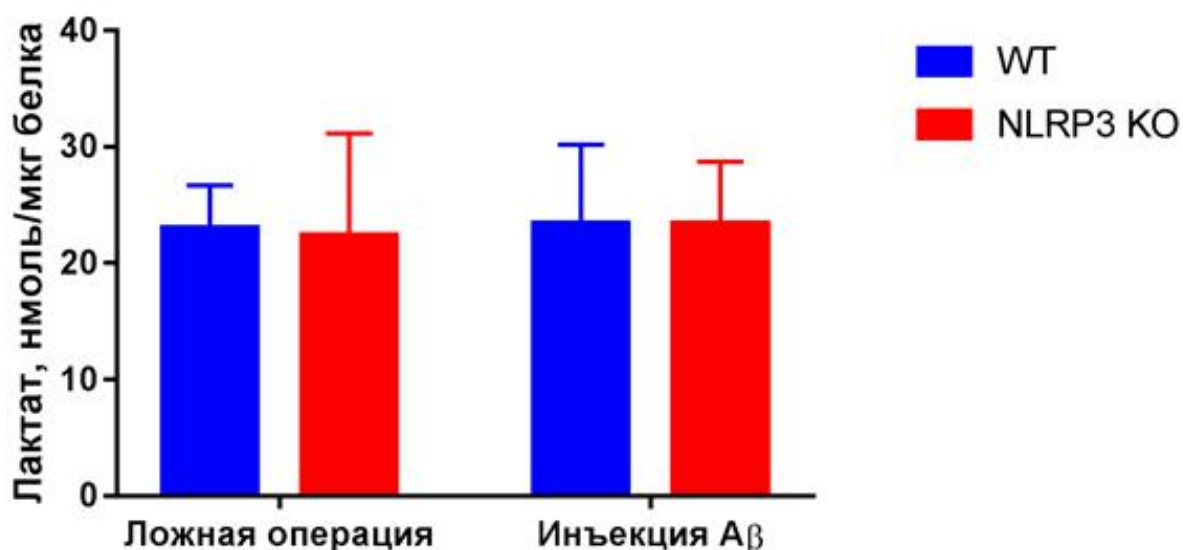


Рисунок 23 – Концентрация лактата в миндалевидном теле головного мозга мышей в исследуемых группах (нмоль/мкг белка). WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. Двухфакторный ANOVA с последующим множественным сравнением с помощью критерия Sidak's.

3.6.2. Результаты определения инсулина

Известно, что сахарный диабет 2 типа увеличивает риск развития БА в два-четыре раза [232], в связи с этим значительное количество исследований стремится понять связи между двумя патологиями и причинами формирования инсулинорезистентности в головном мозге. Сахарный диабет характеризуется гиперинсулинемией, инсулинорезистентностью и гипергликемией. Современные данные свидетельствуют о том, что гиперинсулинемия, даже без сахарного диабета, может удвоить риск

развития болезни Альцгеймера [165]. Было показано, что гиперинсулинемия связана с повышенным риском развития БА и наличием амилоидных бляшек [264]. Сообщалось, что пациенты с БА имеют более высокий уровень инсулина в крови по сравнению со здоровым контролем [170]. Поэтому высокий инсулин, в частности, может модулировать риск развития БА несколькими потенциальными способами [235].

В данном эксперименте был определен уровень инсулина в миндалевидном теле головного мозга методом иммуноферментного анализа. При определении уровня инсулина в миндалевидном теле головного мозга животных контрольной группы и нокаутных *Nlrp3* мышей не было выявлено достоверных различий в экспрессии инсулина в миндалевидном теле головного мозга. Так не выявлено влияния взаимодействия двух факторов (генотипа и операции) ($F(1,28)=3,314$, $p=0,0794$, двухфакторный ANOVA), а также фактора генотипа ($F(1,28)=2,495$, $p=0,1255$) и операции ($F(1,28)=0,4199$, $p=0,5223$) (Рисунок 24).

При этом следует отметить, что при введении бета-амилоида 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 бета-амилоида *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).

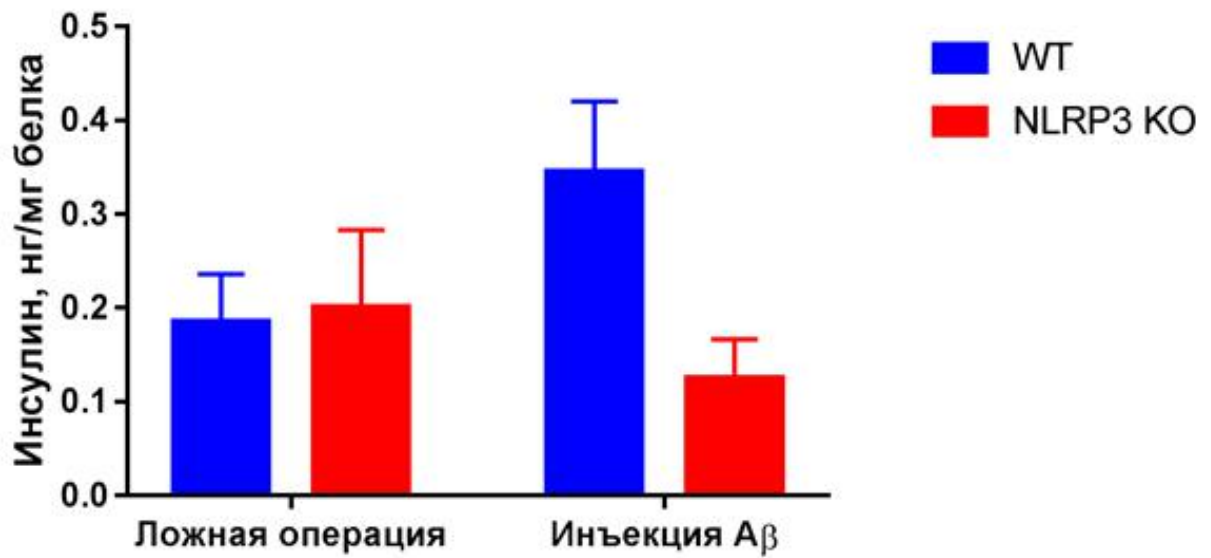


Рисунок 24 – Концентрация инсулина в миндалевидном теле головного мозга мышей в исследуемых группах (нг/мг белка). WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. Двухфакторный ANOVA с последующим множественным сравнением с помощью критерия Sidak's.

3.6.3. Результаты определения IL1 β

Продукция IL-1 β в течение длительного времени была связана при нейровоспалении и нейродегенерации как с полезными, так и с пагубными последствиями. Однако потенциальная роль воспаления NLRP3 в локальной продукции IL-1 β в мозге все еще остается неизученной. В последнее время появилось несколько сообщений о исследовании активации воспаления при нейровоспалительных и нейродегенеративных условиях, несмотря на то, что остается много неосвещенных вопросов [116].

В данном исследовании была определена концентрация IL β в миндалевидном теле головного мозга у мышей дикого типа и *Nlrp3* нокаутных при моделировании болезни Альцгеймера (Рисунок 25). При проведении сравнения групп выявлено статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (генотипа и операции) – $F(1,28)=5,171$, $p=0,0308$, а также статистически значимое влияние каждого фактора по отдельности – генотипа: $F(1,28)=35,99$, $p<0,0001$; операции: $F(1,28)=4,99$, $p=0,0336$, двухфакторный ANOVA.

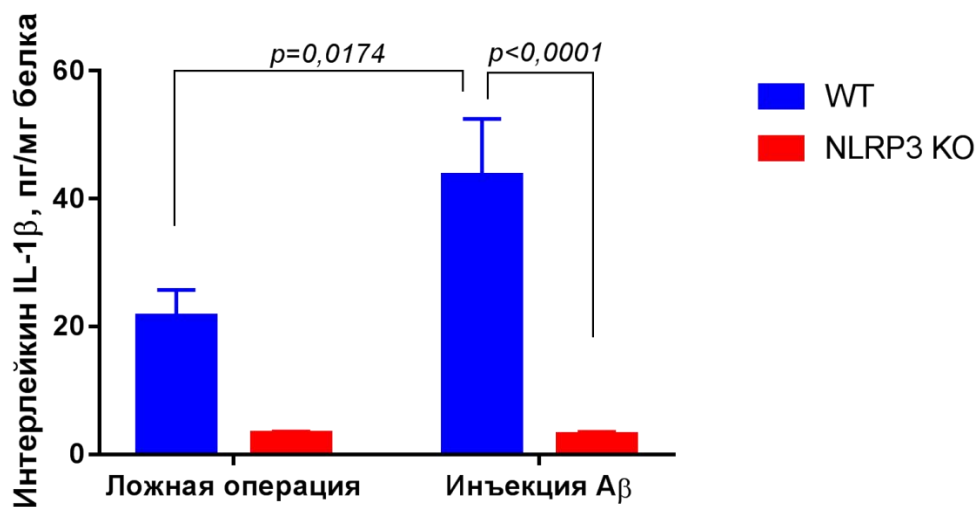


Рисунок 25 – Концентрация интерлейкина IL-1 β в миндалевидном теле головного мозга мышей в исследуемых группах (пг/мг белка). WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. Двухфакторный ANOVA с последующим множественным сравнением с помощью критерия Sidak's

При исследовании уровня IL1 β во всех группах *Nlrp3* нокаутных животных были определены следовые количества IL1 β . При множественном сравнении выявлено является увеличение экспрессии IL1 β в миндалевидном теле головного мозга в группе контрольных животных при моделировании болезни Альцгеймера ($43,6 \pm 8,84$ 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, инъекция бета-амилоида вызывает увеличение концентрации интерлейкина 1 бета в миндалевидном теле головного мозга мышей дикого типа.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Болезнь Альцгеймера представляет собой нейродегенеративное расстройство, характеризующееся тяжелым дефицитом когнитивных функций. Одним из основных гистопатологических отличительных признаков БА является наличие внеклеточных сенильных бляшек, которые содержат агрегированные амилоидные пептиды. Накопление бета-амилоида в головном мозге приводит к синаптическим дефицитам, которые, в свою очередь, ведут к когнитивным нарушениям. Помимо потери памяти и когнитивной дисфункции, пациенты с БА часто проявляют патологические эмоциональные состояния, включая тревожность, маниакальные и депрессивные эпизоды и измененный статус страха [131]. Это проявляется как множество нейропсихиатрических симптомов, включая нарушение эмоциональной памяти, апатию, агрессию, растормаживание, тревогу и измененную реакцию страха [236].

Нейронные цепи, вовлеченные в формирование ассоциативной памяти, были широко изучены и известно, что они включают как миндалину [146], так и гиппокамп [203]. В соответствии с паттерном патологии, при болезни Альцгеймера наблюдается дефицит как в обучении, так и в условно-рефлекторном замирании [131]. Миндалина, в дополнение к гиппокампу, является важной областью мозга, на которую воздействуют амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки [270].

Хорошо известно, что именно миндалевидное тело участвует в реализации эмоционального поведения, такого как депрессия, память страха и тревожность [218]. Это ключевая структура в формировании ассоциативной памяти [63]. В нескольких исследованиях отмечалась выраженная атрофия миндалевидного тела, вызванная А β , и сообщалось, что эта атрофия коррелирует с эмоциональными изменениями, такими как

формирование условного страха уже на ранних стадиях болезни Альцгеймера [202]. Однако физиологические функции и молекулярные механизмы, в которые вовлечено миндалевидное тело при болезни Альцгеймера, остаются до конца не изученными [270].

4.1. Эмоциональная память, локальная инсулинорезистентность и нейровоспаление при моделировании болезни Альцгеймера

В ходе проведенного эксперимента полученные результаты свидетельствуют о том, что растворимые олигомеры A β 1-42 могут резко ухудшить формирование контекстуальной и сигнальной памяти страха.

Важно отметить, что поскольку для приобретения ассоциативной памяти требуется только одна обучающая попытка (формирование условно-рефлекторного замирания), данный тест очень подходит для анализа различных этапов памяти (приобретения, консолидации, хранения и извлечения), что позволяет проверить вклад каждого этапа памяти в развитие патологии, связанной с потерей памяти [148]. Мы предполагаем, что ухудшение формирования контекстуальной и сигнальной памяти страха, вызванное бета-олигомерами, может быть использовано для проверки потенциальных механизмов потери памяти, ассоциированных с БА.

Данные, полученные при исследовании головного мозга пациентов, страдающих от БА, показали, что амилоидные бляшки не всегда обязательно предшествуют возникновению когнитивных нарушений [39]. Напротив, амилоидные отложения наблюдались у людей без когнитивного дефицита [189]. Эти наблюдения показывают, что старческие амилоидные бляшки не всегда могут клинически коррелировать с проявлениями БА. Учитывая, что было высказано предположение, что малые растворимые олигомерные

разновидности Аβ (Аβ 1-42), а не амилоидные бляшки, могут быть нейротоксичными и ответственными за синаптические и нейронные дисфункции, приводящие к патофизиологическим последствиям при БА [49]. Поэтому связывание растворимых агрегатов Аβ с клеточными мембранами может приводить к множественным эффектам, влияющим на различные пути, ведущие постепенно к когнитивным расстройствам [180].

В целом и ввиду ограниченности экспериментов, исследующих потенциальный долговременный эффект растворимого Аβ [90], целью этого этапа было исследование долгосрочного воздействия инъекций олигомеров Аβ1-42 в гиппокамп на мнемонические и молекулярные процессы, которые нарушаются при БА. Для изучения токсичности олигомеров бета-амиоида были применены экспериментальные подходы с изучением поведенческих последствий, вызванные внутримозговыми инъекциями Аβ.

Эффекты растворимых олигомеров Аβ1-42 на обучение должны интерпретироваться с осторожностью, поскольку они могут быть вызваны нарушением обнаружения условного раздражителя (CS: белый шум) или безусловного стимула (US: электрический ток). Однако в эксперименте не наблюдался эффект Аβ1-42 на приобретение памяти страха. Это показывает, что инъекция Аβ1-42 не нарушала слуховые функции или способность ощущать электрический шок. Кроме того, инъекция Аβ1-42 не изменяла процент замирания в течение первого дня теста (при создании условий для замирания). Это указывает на то, что мыши с введением Аβ1-42, смогли обнаружить как CS (условный раздражитель), так и US (безусловный раздражитель) [148].

В любом случае наши данные соответствуют предыдущим исследованиям, в которых сообщалось о воздействии олигомеров Аβ1-42 на обучение и консолидацию [44]. Контекстная память является гиппокамп-зависимой, в то время как сигнальная память не зависит от гиппокампа [137], что указывает на то, что специфическое нарушение контекстной памяти во второй день тестирования было вызвано олигомерами Аβ1-42. Ранее было

показано, что инъекция олигомеров A β 1-42 нарушает ремоделирование синапсов в гиппокампе [98] и повышает уровень глутамата в гиппокампе [193]. Выявленное негативное влияние на сигнальную память, тестируемую в третий день, может свидетельствовать о том, что доля введенного A β 1-42 достигает базолатеральной миндалины, которая является областью мозга, критической для формирования вызванных тоном воспоминаний о страхе [137, 150, 169]. Кроме того, ранее было показано, что миндалевидное тело вместе с гиппокампом является одной из первых областей мозга, пораженных у пациентов с БА [214].

Наше обнаружение того, что растворимые олигомеры A β 1-42 резко ухудшают формирование контекстной памяти страха, согласуется с предыдущими исследованиями, в которых вводили олигомеры A β 1-42 в желудочек или гиппокамп [113, 153]. Результаты данного исследования также соответствуют мнению, которое поддерживает причинную роль растворимых олигомеров A β 1-42 при БА, связанную с потерей памяти [208].

Тем не менее, на сегодняшний день имеются в литературе разрозненные противоречивые результаты о влиянии бета-амилоида, которые, по-видимому, зависят от места инъекции и природы пептида [65]. Насколько известно, только несколько исследований оценили влияние непосредственной инъекции олигомеров A β 1-42 в дорзальный гиппокамп на процессы памяти. Однако недавние данные показали, что инфузия олигомеров A β (1-42) внутрь гиппокампа повлияла на рабочую память, когда показатели памяти оценивались всего через 10 мин после инъекции, что указывает на то, что такие дефициты могут быть связаны с острым нейротоксическим эффектом пептида [198]. Напротив, долговременные эффекты A β олигомерных сборок внутри гиппокампа на рабочую память, которая сильно поражена на ранних стадиях БА, остаются плохо охарактеризованными [90].

Мы обнаружили, что инъекции олигомеров бета-амилоида (1-42) в дорзальный гиппокамп (dCA1) вызвали дефициты в этапах формирования

памяти (контекстной и сигнальной), что может отражать повреждение этапа консолидации памяти страха, а также хранения и извлечения. Данные литературы описывают нарушение в приобретении рабочей памяти, но не в пространственной памяти, когда мышей тестировали через 7-9 дней после операции. В том же исследовании было продемонстрировано, что олигомеры A β 1-42, введенные в dCA1, препятствует последовательной активации, вызванной последовательной активацией ERK1/2 в различных структурах мозга, включая дорсальный гиппокамп (в частности, область DG, но не dCA1, ни CA3) пред-лимбической коры и медиальной перегородки. Поскольку когнитивные и молекулярные изменения наблюдались в то время, когда амилоидные бляшки больше не были видны в дорсальном гиппокампе, представляется разумным думать, что локальная инфузия A β 1-42 вызвала длительные молекулярные и клеточные изменения, включая нейровоспалительные процессы, которые изменяют функцию памяти [90].

В многочисленных исследованиях были рассмотрены эффекты центральной инфузии A β (1-42) на обучение и память [65], но последовательных результатов не появилось [106]. В то время как в некоторых исследованиях сообщалось об ухудшении пространственной памяти в тесте «Водный лабиринт Морриса» после инфузии A β [168], некоторые другие не выявили недостатков в памяти. Среди немногих исследований, которые исследовали влияние локальных инъекций A β в дорсальный гиппокамп, большинство из них вливали агрегированные формы A β 1-42. Рассматривая краткосрочную или рабочую память, эти исследования выявили нарушение пространственной и непространственной памяти, когда животных тестировали через некоторое время после инфузии A β 1-42 [70].

Однако настоящий эксперимент продемонстрировал изменения в различных этапах формирования памяти на более ранней стадии заболевания, сосредоточив внимание на олигомерных формах A β , которые предположительно отвечают за нейротоксический эффект пептида [258].

Маркеры инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера

Метаболизм глюкозы в головном мозге очень четко регулируется, и его нарушение является важной особенностью нейродегенеративных расстройств. Гипометаболизм глюкозы наблюдается у здоровых пожилых людей [266] и при некоторых других прогрессирующих нейродегенеративных расстройствах, проявляющих когнитивный дефицит [252]. При болезни Альцгеймера гипометаболизм глюкозы предшествует возникновению дефицита памяти и предположительно является предиктором прогрессирования болезни [190].

Кроме того, последние данные показывают, что инсулин модулирует гиппокампальную память через инсулин-зависимый глюкозный транспортер GLUT4 [197].

В ходе проведенного эксперимента впервые было подтверждено, что IRAP был локализован с GLUT4 в БЛМ головного мозга. Наблюдали почти полную колокализацию IRAP с GLUT4 в группе контрольных животных. Полученные данные соответствуют полученным ранее результатам, свидетельствующим о колокации этих маркеров в регионах головного мозга, ответственных за память и обучение [91].

Согласно литературным данным еще один пример почти полной колокации двух белков в жировой ткани и мышцах, где IRAP служит маркером для специализированных везикул, содержащих GLUT4. Предполагается, что в этих тканях IRAP играет роль в регуляции транспорта GLUT4 везикул. Это подтверждается микроинъекцией цитоплазматического домена IRAP в эти клетки, что приводит к мобилизации GLUT4 к плазматической мембране, что облегчает поглощение глюкозы [262]. Напротив, в областях мозга, связанных с двигательными функциями, такие как мозжечок, распределения двух маркеров довольно разрозненно.

Кроме того, было продемонстрировано, что инсулин-зависимую аминопептидазу IRAP в головном мозге экспрессируют как нейроны, так и глиальные клетки. Полученные данные являются новыми и оспаривают

более ранние, что только нейроны способны экспрессировать инсулин-зависимую аминопептидазу [91].

Также полученные данные свидетельствуют, что инъекция олигомеров бета-амилоида в гиппокамп мышей приводит к значимому снижению GLUT4 в БЛМ головного мозга, при этом неожиданно увеличивается экспрессия IRAP.

Согласно последним данным, для использования инсулина в концентрациях выше базальной для усиления пространственной рабочей памяти необходим GLUT4. Это свидетельствует о том, что супрабазальные уровни инсулина влияют на память через определенные пути (то есть опосредованно через GLUT4), в то время как базальный уровень инсулина не требует такого участия (то есть не опосредованно через GLUT4). Эти данные свидетельствуют о том, что повышенная экспрессия GLUT4 в гиппокампе, наблюдаемая во время тестирования, может быть задействована в процессах памяти, отличных от пространственной рабочей памяти, таком как, возможно, консолидация памяти [197].

Кроме того, увеличенный уровень экспрессии GLUT4 может быть ответом на увеличение метаболической нагрузки во время формирования памяти, и, возможно, играет большую роль во время длительных познавательных действий. Основной вывод этого исследования состоит в том, что воздействие экзогенного инсулина на память гиппокампа и использование глюкозы зависит от GLUT4 [197].

Таким образом, снижение экспрессии инсулин-зависимого глюкозного переносчика GLUT4 объясняет ухудшение в выполнении тестов у мышей экспериментальной группы во второй контекстный и третий сигнальный день, которые связаны с непосредственной консолидацией памяти у животных. Это приводит к заключению, что снижение экспрессии маркера GLUT4 может быть использовано для диагностики когнитивных нарушений, а также свидетельствует о вовлечении этого пути в развитие когнитивных дефицитов при болезни Альцгеймера.

Изменение экспрессии IRAP в нейронах и астроцитах при моделировании болезни Альцгеймера

Предыдущие исследования показали, что IRAP участвует в обеспечении гомеостаза глюкозы путем регуляции GLUT4 в клетках, чувствительных к инсулину; протеолитический контроль концентрации окситоцина во время беременности, чтобы предотвратить начало преждевременных родов; регулирование уровней окситоцина и вазопрессина головного мозга, модулирование сложных социальных форм поведения, таких как доверие, привязанность, беспокойство и участие в когнитивных функциях и формировании памяти в головном мозге [127].

Как уже было отмечено, IRAP обнаруживается в специализированных везикулах, содержащих чувствительный к инсулину переносчик глюкозы GLUT4 в нейронах гиппокампа, а также в других областях мозга, таких как гипоталамус, пириформная и энторинальная кора, гипофиз, обонятельная луковица и большинство неокортикальных областей [134]. Оба маркера транслоцируются из этих пузырьков на клеточную поверхность в ответ на определенные стимулы, такие как инсулин [92], хотя эта транслокация не гарантирует активность GLUT4, так как везикулы также должны соответствующим образом сливаться с плазматической мембраной [160]. GLUT4 в значительной степени способствует усвоению столь необходимой глюкозы во время когнитивных функций, связанных с формированием памяти. Тем не менее, остаются противоречивые мнения относительно экспрессии IRAP в клетках головного мозга в норме и при патологии. Так было описано действие IRAP на нейропептиды, участвующие в обучении и памяти [223].

Важную группу субстратов IRAP помимо гормонов и вазоактивных пептидов, представляют нейропептиды, участвующие в обучении и памяти. Учитывая, что память может быть улучшена путем введения ангиотензина IV (AT4) [35], неожиданная идентификация IRAP как высокоаффинного рецептора ангиотензина (AT4) в головном мозге [32] вызвала множество

усилий, направленных на характеристику роли IRAP в формировании памяти и обучении. Группа Albiston and Chai сначала показала, что АТ4 является ингибитором с высоким сродством IRAP путем связывания с активным центром фермента [161] и позднее был разработан новый класс ингибиторов IRAP, которые являются «когнитивными усилителями» [33]. Первоначально было рассмотрено несколько гипотетических механизмов усиления памяти, индуцированного АТ4 [240]. Однако сегодня все еще остается невозможным сделать окончательный вывод о роли IRAP в качестве рецептора АТ4 и в механизмах памяти. Даже анализ IRAP-дефицитных мышей не пролил света на эту проблему. Явный результат, полученный с использованием этих мышей, заключается в том, что в отсутствие IRAP сайта с высокой аффинностью связывания для АТ4 исчезает в мозге и других тканях, что является убедительным доказательством того, что IRAP является рецептором АТ4. Тем не менее, анализ фенотипа памяти IRAP-нокаутных мышей показал неожиданные результаты. Несмотря на то, что острое введение ингибиторов IRAP стимулирует запоминание, удаление гена IRAP у мышей не улучшает память [34].

В текущем исследовании было продемонстрировано, что введение растворимых олигомеров бета-амилоида приводит к увеличению интенсивности экспрессии IRAP в клетках нейрональной и глиальной природы. Это исследование может подтвердить использование ингибиторов IRAP, которые, как было показано, улучшают память [33].

До недавнего времени считалось, что IRAP является исключительно нейрональным белком в здоровом мозге, однако были получены доказательства экспрессии IRAP в активированных астроцитах у лабораторных животных с болезнью Альцгеймера. Было также подтверждено, что IRAP широко экспрессируется не только в активированных астроцитах, связанных с действием бета-амилоида, но также IRAP также обнаружен в контроле в астроцитах БЛМ.

Маркеры воспаления при болезни Альцгеймера

Известно, что молекулы DAMPs (damage-associated molecular patterns), к которым относится бета-амилоид, запускают сборку инфламмасом в очаге воспаления в головном мозге [6, 195], [87, 282].

Было продемонстрировано, что инфламмосомы, экспрессирующие NLRP3, могут быть активированы бета-амилоидом *in vitro*, что приводит к воспалению и повреждению тканей [118].

Поскольку к числу наименее изученных молекулярных событий при нейровоспалении следует отнести процесс формирования инфламмасом при действии олигомеров A β в клетках именно нейрональной природы, была изучена экспрессия NLRP3 инфламмасом в NeuN⁺ клетках (маркирующих зрелые нейроны). Наиболее хорошо изученным является процесс формирования инфламмасом в клетках микроглии и астроглии [26, 255].

В данном исследовании при моделировании болезни Альцгеймера выявлено увеличение экспрессии NLRP3 инфламмасом в зрелых нейронах. Ранее уже было показано, что у NLRP3- и каспаза-1-нокаутных мышей, несущих генетические мутации, связанные с развитием семейной формы болезни Альцгеймера, выявлено отсутствие нарушений пространственной памяти и других осложнений, наблюдаемых при БА, а также показано сокращение активности каспазы-1 и интерлейкин-1 β на фоне снижения отложения бета-амилоида [126].

Также ранее было продемонстрировано, что нейроны начинают экспрессировать инфламмосомы *in vivo* и *in vitro* в ответ на острое повреждение головного мозга, стресс и в моделях нейровоспаления и нейродегенеративных заболеваний на животных. Так, было показано, что при БА наблюдалось 25-30-кратное увеличение экспрессии иммунопозитивных нейронов, экспрессирующих инфламмосомы NLRP1 [140]. В дополнении к этому, увеличение числа NLRP1/NeuN⁺ клеток наблюдается и у APP^{swe} / PS1^{dE9} трансгенных мышей [50]. Следовательно, токсическое действие бета-

олигомеров сопровождается формированием инфламмасом в миндалинах головного мозга.

Таким образом, в текущем исследовании было показано, что инъекция бета-амилоида в дорсальный гиппокамп приводит к изменениям, ассоциированным с миндалиной. Введение бета-олигомеров сопровождалось снижением экспрессии инсулин-зависимого глюкозного переносчика GLUT4 и увеличением инсулин-регулируемой аминопептидазы IRAP в зрелых нейронах и активированных астроцитах, что вызвало нарушения в этапах формирования памяти (консолидации, хранении и извлечении). 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. Полученные данные резюмированы в схеме, представленной на рисунке (Рисунок 26).

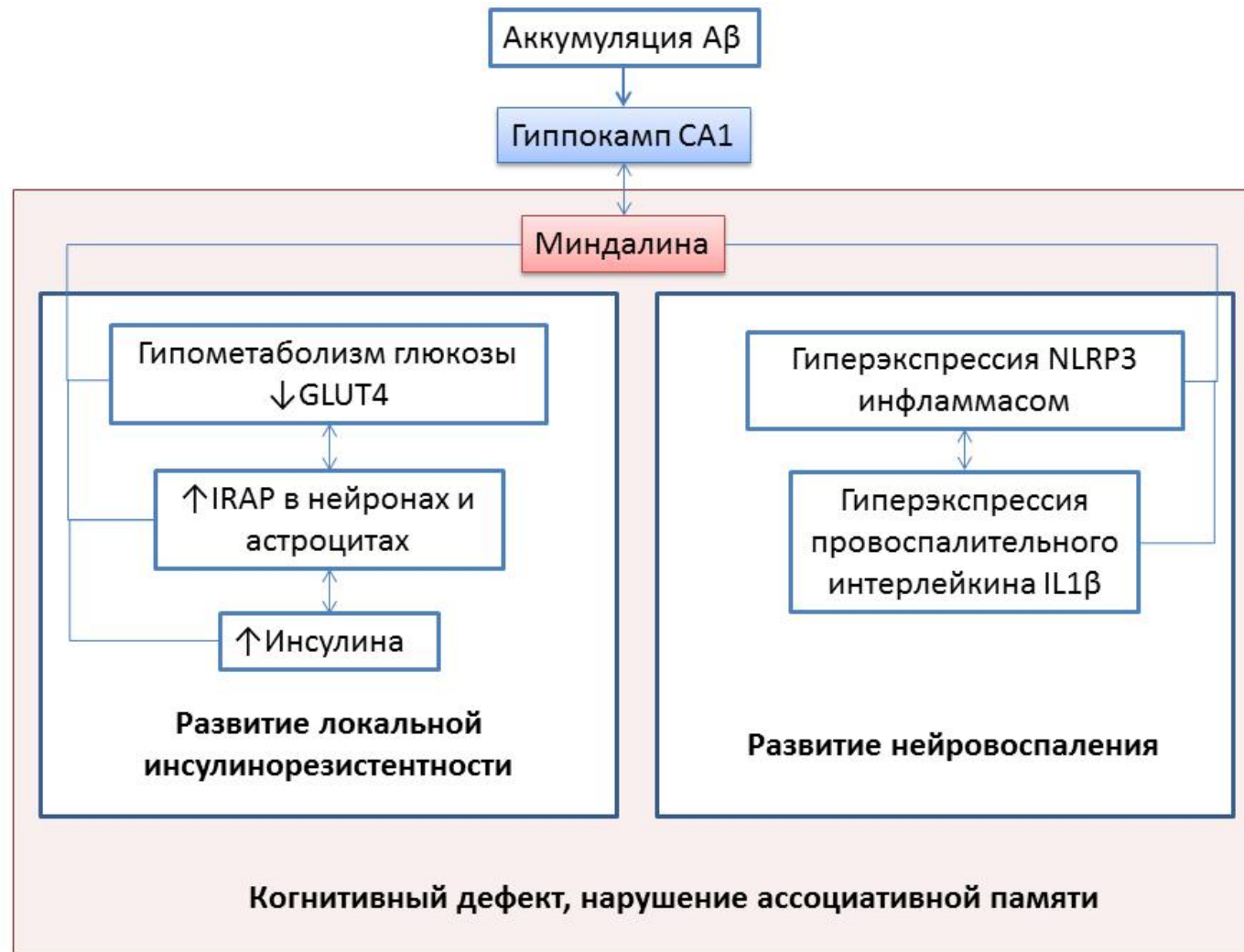


Рисунок 26 — События, происходящие в базолатеральной миндалине головного мозга после инъекции растворимых бета-олигомеров в дорсальный гиппокамп. oAβ – олигомеры бета-амилоида.

4.2. Роль NLRP3 инфламماسом в реализации когнитивных функции и инсулин-регулируемом перемещении глюкозного транспортера

Известно, что инфламماسомы участвуют в патогенезе многих заболеваний, ассоциированных с воспалением, в том числе и развитии БА [171]. Примечательно, что такие воспалительные заболевания относятся к т.н. стерильному воспалению, когда воспаление происходит без чужеродных патогенов. Недавно обсуждалось развитие перспективных терапевтических средств, которые модулируют воспалительную активность при этих заболеваниях [115].

Однако, согласно большинству последних исследований, преобладает следующая точка зрения: инфламماسомы NLRP3 участвуют в развитии депрессивного поведения у грызунов в условиях хронического стресса или при действии липополисахарида [194, 277]. В совокупности было продемонстрировано, что NLRP3 инфламماسома может быть потенциальной терапевтической мишенью для коррекции расстройств поведения, таких как депрессия [268]. Поэтому увеличение числа полученных данных свидетельствует о том, что нейровоспаление, ассоциированное с гиперэкспрессией NLRP3, вызывающее повышенную продукцию провоспалительных цитокинов в головном мозге, занимает центральное место в патогенезе развития тревоги, когнитивной дисфункции и депрессии [219].

Также была определена роль провоспалительных цитокинов в реализации когнитивных функций. Так на сегодняшний день существует ряд исследований, свидетельствующих о том, что цитокины участвуют как в краткосрочных, так и в долгосрочных изменениях синаптической пластичности. Однако является ли NLRP3 инфламماسомы в ЦНС вовлеченными в развитие инсулинорезистентности головного мозга до сих пор остается неизученным.

Таким образом, настоящая часть исследования была посвящена изучению вклада инфламмасом NLRP3 в участие в экспериментальном условно-рефлекторном замирании, а также определению экспрессии инсулин-регулируемой аминопептидазы и инсулин-регулируемого перемещения глюкозного транспортера. Были оценены поведенческие и иммуногистохимические изменения для оценки роли нейровоспаления в миндалевидном теле лимбической системы мышей.

Эмоциональная память у *Nlrp3* нокаутных мышей

После активации NLRP3 активирует связанный с апоптозом спексоподобный белок (ASC), который содержит домен каспазы и прокаспазу-1. Прокаспазу-1, в свою очередь, протеолитически расщепляет про-интерлейкин (IL) -1 β и про-IL-18, образуя их активные формы, что усугубляет воспалительную реакцию [85]. В настоящее время преобладает точка зрения о том, что воспаление может сыграть решающую роль в патофизиологии тревожности, депрессии и дефиците памяти [162]. Кроме того, в нескольких исследованиях было высказано предположение о том, что NLRP3 инфламмоса способствует развитию депрессивного расстройства и дефицита памяти [243].

Тем не менее, с другой стороны было показано, что провоспалительный цитокин IL-1 β играет критическую роль в формировании зависимой от гиппокампа памяти. Таким образом, IL-1 β активируется посредством формирования ассоциативной памяти [111] и LTP [211]. Но в то же время хроническая гиперэкспрессия IL-1 β в гиппокампе приводит к ухудшению пространственной и ассоциативной памяти [178]. Поэтому IL-1 β имеет двойную роль: цитокин, высвобождаемый при низких концентрациях и при нормальных физиологических условиях, важен для долговременной консолидации памяти посредством активации астроцитов для получения нейротрофического фактора мозга (BDNF) и фактора некроза опухоли (TNF), а также дополнительного глутамата и лактата, которые важны для долговременной консолидации памяти [111]. Согласно этим исследованиям

физиологические уровни формирования памяти поддерживают IL-1 β , но любое отклонение от этого физиологического уровня приводит к нарушенной когнитивной функции.

Хотя созревание интерлейкина-1 β опосредуется через инфламмосомы, основной точкой зрения остается то, что нокаутные животные *Nlrp3* устойчивы к развитию депрессии [278] и защищены от когнитивных нарушений во время старения [275]. По аналогии с IL-1 β , непосредственно NLRP3 инфламмосомы также могут играть роль в процессах консолидации памяти, развитии тревожности. А именно, как IL-1 β , NLRP3, оставаясь на низком базальном уровне, может поддерживать консолидацию памяти, что и было продемонстрировано в данном исследовании.

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

Еще одним интересным наблюдением данного исследования является изменение морфологии астроцитов у *Nlrp3* нокаутных мышей. Недавно было продемонстрировано, что активация toll-подобных рецепторов в астроцитах имеет просинаптогенный эффект. Эти результаты подтверждают основную функцию астроцита во время постнатального развития и подтверждают ключевую роль toll-подобных рецепторов в астроцитах в регуляции постнатального возбуждения синапса [229]. Логично предположить, что NLRP3 также играет ключевую роль в синаптической передаче, как toll-подобные рецепторы, которые также необходимы для индукции врожденных иммунных реакций. Таким образом, у животных, не экспрессирующих *Nlrp3*, наблюдается изменённая морфология астроцитов.

Маркеры инсулинорезистентности у *Nlrp3* нокаутных мышей

В нашем исследовании мы предположили, что экспрессия и отсутствие инфламмосом будет влиять на формирование локальной

инсулинорезистентности. Такая гипотеза является интересной и имеет предпосылки, тем не менее, она нуждается в проведении экспериментов *in vivo*. Поддерживая роль воспаления в индуцированной ожирением резистентности к инсулину, три исследования показали, что делеция компонентов воспаления, включая NLRP3, Рycard, каспазу 1 или ASC, обладает положительным эффектом на инсулинорезистентность за счет подавления воспаления [263]. Однако детали этих трех исследований различаются, особенно с точки зрения влияния удаления воспалительного компонента на массу тела и ожирение. Тем не менее, такие исследования были проведены для изучения влияния воспаления при ожирении. Следовательно, в настоящий момент остается не ясным, регулирует ли воспалительный путь резистентность к инсулину напрямую или действует опосредованно. Поэтому мы изучили экспрессию маркеров GLUT4 и IRAP в базолатеральной миндалине головного мозга.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении экспрессии IRAP в лимбической системе (миндалевидном теле) в нейронах и астроцитах, что, как уже обсуждалось выше, согласуется с данными, доказывающими эффективность приема ингибиторов инсулин-зависимой аминопептидазы как «когнитивных энхансеров». Тем не менее, существуют данные, что сниженная экспрессия IRAP в гипоталамусе ассоциирована с развитием шизофрении [51].

Также высказано предположение о том, что гипоталамическая экспрессия IRAP может быть тесно связана с нейропептид-нейрофизиновой системой (системами), поскольку IRAP является вазопрессин- и окситоцин-деградирующим ферментом [51]. Это явление находит дополнительную поддержку после посмертных исследований головного мозга пациентов с расстройствами настроения. Ранее было показано, что плотность клеток IRAP-экспрессирующих нейронов в паравентрикулярном ядре повышается у лиц с депрессией [181].

Кроме того, было продемонстрировано, что обработка клеток или введение IL-1 β животным индуцирует резистентность к инсулину, ингибируя путь передачи сигналов инсулина [136]. Также, лечение тучных животных антителами против IL-1 β улучшает резистентность к инсулину, хотя это, как полагают, в основном обусловлено улучшением β -клеточных функций [192]. Следовательно, несмотря на то, что воспаление и его целевые цитокины, IL-1 β и IL-18, являются важными медиаторами врожденного иммунитета, они могут также играть роль в развитии индуцированного ожирением воспаления и резистентности к инсулину [158].

Также было продемонстрировано снижение экспрессии GLUT4 в БЛМ головного мозга мышей, нокаутированных по *Nlrp3*. Известно, что уровень GLUT4 в головном мозге может зависеть от уровней инсулина; мышей с пониженной инсулиновой сигнализацией в головном мозге. Так у мышей с нокаутированием рецептора нейронального инсулина [NIRKO] наблюдается 68% -ное снижение GLUT4 в гипоталамусе [83]. Кроме того, у грызунов с дефицитом инсулина и проявлениями сахарного диабета наблюдалось снижение GLUT4. Интересно, что GLUT4 сосуществует с рецептором инсулина в глюкозочувствительных нейронах [139]. Также можно заключить, что в зависимости от действия инсулина в мозге или независимо от его активности, GLUT4 стратегически расположен для поставки глюкозы и модулировании гомеостаза глюкозы всего тела [210].

Таким образом, сниженный уровень инсулин-зависимого глюкозного транспортера у мышей, нокаутных по *Nlrp3*, может косвенно свидетельствовать о снижении инсулина. Это объясняется тем, что инсулин стимулирует экспрессию гена GLUT4 и его транспорт из цитоплазмы к плазматической мембране, тем самым модулируя поглощение и утилизацию глюкозы. Таким образом, инсулин сигнальный путь играет ключевую роль в регуляции трансмембранного транспорта глюкозы [66].

Как уже было описано выше, для консолидации памяти требуются супрабазальные уровни инсулина, действие которого опосредуется через

GLUT4. Этим объясняется нарушенное приобретение памяти в первый день тестирования, т.к. сниженная экспрессия GLUT4 может затруднять процесс консолидации памяти [197]. Иными словами, для успешной консолидации памяти необходим базальный уровень локального воспаления, т.е. экспрессии NLRP3 инфламмасом как в группе контроля, что участвует в процессах запоминания. Для дальнейшей интерпретации данных результатов была проведена другая серия экспериментов с инъекцией олигомеров бета-амилоида мышам, нокаутным по *Nlrp3*.

Таким образом, было показано, что у *Nlrp3* нокаутных животных нарушен процесс приобретения памяти в первый день создания условий для замирания и 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.

На основании полученных данных, можно предположить, что экспрессия базального уровня NLRP3 инфламмасом сопровождает процессы запоминания. Полученные данные отображены на рисунке (Рисунок 27).

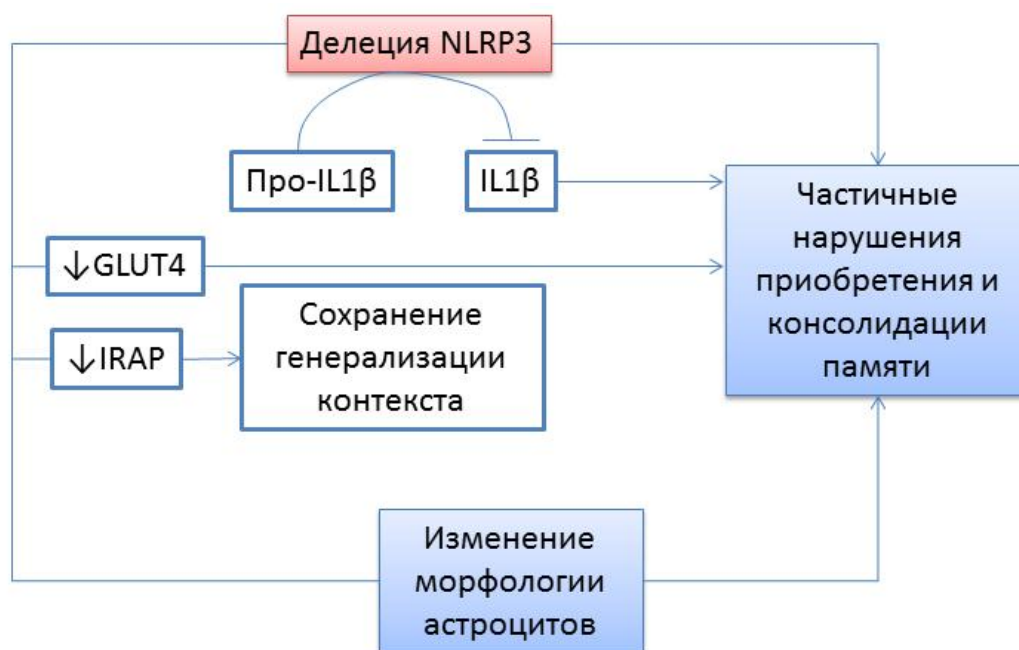


Рисунок 27 — События в базолатеральной миндалине головного мозга, сопровождающие делецию NLRP3 инфламмасом.

4.3. Вклад нейровоспаления, вызванного действием растворимых олигомеров бета-амилоида A β , на эмоциональную память и передачу сигнала инсулина

С учетом того, что в большинстве исследований доминирует оценка когнитивной дисфункции, в то время как изменениям эмоциональной сферы при болезни Альцгеймера уделяют меньше внимания, в настоящей части исследования было изучено влияние растворимых форм олигомеров бета-амилоида 1-42 на эмоциональную память мышей, нокаутных по *Nlrp3*.

В данном блоке были исследованы молекулярные механизмы нарушения продукции, передачи сигнала и эффектов инсулина в клетках нейрональной природы у животных, не экспрессирующих инфламмосомы, для определения вклада нейровоспаления в прогрессирование нарушений эмоциональной сферы и нейродегенерации при экспериментальной болезни Альцгеймера.

В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что инъекция бета-амилоида в гиппокамп мышей дикого типа приводит к снижению времени замирания во всех тестируемых днях по сравнению с проведением ложной операции. Тем не менее, важной находкой является то, что инъекции бета-амилоида не имеют статистически значимого влияния на мышей с нокаутированием гена *Nlrp3*, т.е. время замирания в тесте не отличается между группами.

Ранее было показано, что A β может активировать сборку инфламмосом NLRP3 в микроглии, что является фундаментальным для секреции IL-1 β . IL-1 β в основном продуцируется из про-IL-1 β , чтобы стать биологически активным. Этот процесс опосредуется инфламмосомами NLRP3, которые индуцируют активацию прокаспазы-1, чтобы способствовать созреванию про-IL-1 β [249]. Эти данные свидетельствуют о том, что формирование инфламмосом сопровождает развитие болезни Альцгеймера. Тем не менее, в

предыдущей части исследования было показано, что *Nlrp3* нокаутные мыши проявляют нарушения когнитивных функций, а также для них характерно снижение экспрессии GLUT4. Такие находки являются абсолютными новыми, однако они не подтверждают полученные ранее данные об улучшении когнитивных функций у животных с *Nlrp3*^{-/-} фенотипом [275].

При удалении *Nlrp3* у мышей с БА, увеличивается фагоцитарная активность микроглиальных клеток, тем самым уменьшается агрегацию Аβ. Также было показано, что отсутствие экспрессии *Nlrp3* у мышей с болезнью Альцгеймера не только предотвращает микроглиальную активацию, но и защищает от нарушения пространственной памяти [126]. Таким образом, ингибирование активности инфламмасом NLRP3 было предложено в качестве возможной терапии БА [74].

Кроме того, последние данные показывают, что нокаут гена *Nlrp3* ингибировал индуцированную хроническим стрессом активацию пути MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа). Также как и нокаутирование *Nlrp3* препятствует активации транскрипционного фактора NF-κB. Такое воздействие, вызванное удалением гена *Nlrp3*, защищает нокаутных животных от депрессивного поведения [242].

В связи с этим мы изучили влияние инъекции бета-амилоида на эмоциональную память у *Nlrp3* нокаутных мышей. У животных дикого типа при введении растворимых форм бета-амилоида выявлено снижение времени замирания по сравнению с группой ложно-оперированных мышей в каждый из трех дней тестирования. Такое снижение времени замирания свидетельствует о нарушенной консолидации памяти, снижении генерализации контекста и нарушении ассоциативного обучения [147].

Весьма интересной является находка, что введение бета-амилоида 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 бета-амилоида 1-42.

Влияние делеции *Nlrp3* на инсулиновую сигнализацию в головном мозге при инъекции бета-амилоида

Десятилетия эпидемиологических исследований установили прочную связь между резистентностью к инсулину и болезнью Альцгеймера (БА) [72]. Нормальная инсулиновая сигнализация ингибирует бета-амилоидную (A β) олигомеризацию и тау-фосфорилирование [248], тогда как данные последних лет свидетельствуют о том, что несколько патологических процессов, наблюдаемых при БА, нарушают сигнализацию инсулина в самом начале патогенеза болезни [142]. Это приводит к запуску каскада, усугубляющему как патологические процессы инсулинорезистентности, так и прогрессирования болезни Альцгеймера.

Субстрат инсулинового рецептора (IRS-1) служит в качестве эффекторной молекулы рецептора инсулина. В исследованиях была продемонстрирована глубоко нарушенная передача сигнала инсулина и IRS-1 в мозгах пациентов с БА [248].

Известно, что у IRS-белков имеются участки фосфорилирования по остаткам серина и треонина. Если происходит фосфорилирование c-Jun N-концевой киназой-1 (JNK1) и другими протеинкиназами, это приводит к ингибированию активности IRS-белков и выключает их из сигнальной трансдукции, что, в конечном счете, приводит к инсулинорезистентности. Сериновое фосфорилирование IRS1 является механизмом резистентности к инсулину. Сер-312-фосфорилирование ингибирует действие инсулина путем нарушения взаимодействия IRS1 с рецептором инсулина [28].

В текущем исследовании была определена экспрессия IRS1, фосфорилированного по остатку серина. В результате было обнаружено увеличение количества IRS1-Ser после моделирования болезни Альцгеймера введением олигомеров бета-амилоида 1-42. Это подтверждает участие

олигомеров в формировании локальной инсулинорезистентности в головном мозге.

Кроме того, было изучено, как изменяется экспрессия IRS1-Ser в нейронах при болезни Альцгеймера, и как это сопряжено с нейровоспалением. Для этого мы изучили экспрессию субстрата инсулинового рецептора, фосфорилированного по серину у *Nlrp3* нокаутных мышей с введением бета-амилоида. Как было показано нашей лабораторией, развитие воспаления в ткани головного мозга при нейродегенерации альцгеймеровского типа связано с формированием NLRP3-инфламмасом и гиперпродукцией провоспалительных цитокинов в нейрогенных нишах головного мозга, что приводит к нарушению процессов синаптогенеза и нейрогенеза, ассоциированных с репарацией или реализацией когнитивных функций [7, 152]. Следовательно, становится весьма вероятным, что такие события могут быть ассоциированы с развитием инсулинорезистентности, особенно с учетом данных о том, что в периферических тканях именно гиперэкспрессия NLRP3 маркирует собой инсулинорезистентность [119].

Впервые было показано, что нокаут *Nlrp3* защищает мышей от патологического воздействия олигомеров бета-амилоида, что проявляется неизменяющимся уровнем экспрессии IRS1-Ser по сравнению с контролем.

Также в эксперименте был определен уровень лактата. Ранее продукцию лактата в головном мозге связывали с ишемией; однако более поздние данные показывают, что его можно обнаружить и в физиологических условиях. В мозге лактат образуется преимущественно в астроцитах из глюкозы или гликогена в ответ на сигналы вследствие активности нейронов. Таким образом, нейроны и астроциты проявляют тесную метаболическую связь. Лактат переносится из астроцитов в нейроны в соответствии с энергетическими потребностями нейронов и обеспечивает сигналы, которые модулируют функции нейронов, включая возбудимость, пластичность и консолидацию памяти. Кроме того, лактат влияет на несколько гомеостатических функций. В целом, лактат обеспечивает

адекватное энергоснабжение, модулирует уровни возбудимости нейронов и регулирует адаптивные функции, чтобы установить «гомеостатический тон» нервной системы [167].

Недавно было подтверждено, что повышение лактата в головном мозге является отличительной чертой старения. В отдельных исследованиях сообщается, что старение связано с повышением уровня лактата в коре головного мозга и гиппокампе. Однако изменение лактата в головном мозге и региональные различия все еще не изучены. В недавнем исследовании изучали уровень лактата и лактатдегидрогеназы в четырех различных областях мозга (коре головного мозга, гиппокампе, черной субстанции и мозжечке) молодых и стареющих мышей. Уровни лактата повышались в четырех областях мозга с максимальным увеличением содержания в черной субстанции у стареющих мышей. Экспрессия ЛДГ -А и ее активность снижалась в коре головного мозга, гиппокампе и черной субстанции без каких-либо изменений этих параметров в мозжечке старых мышей. Активность ЛДГ-В снижалась в гиппокампе, черной субстанции и мозжечке, тогда как ее активность оставалась неизменной в коре головного мозга у стареющих мышей. Соответственно, отношение ЛДГ-А / ЛДГ-В-активности остается неизменным в гиппокампе и черной субстанции, уменьшается в коре головного мозга и увеличилось в мозжечке. Таким образом, повышение уровня лактата в трех областях головного мозга (коре головного мозга, гиппокампе, черной субстанции), по-видимому, не коррелировало с изменениями активности регуляторных ферментов в этих трех областях мозга, а скорее подтверждает факт участия других механизмов, таких как транспорт лактата и/или аэробного/анаэробного метаболизма как возможная причина роста лактата в этих трех областях мозга. В целом, такое исследование показывает, что механизм роста лактата в мозге варьируется в зависимости от областей мозга [75].

В текущем исследовании был определен уровень лактата в миндалевидном теле головного мозга иммуноферментным методом. Не было

выявлено статистически значимых различий в содержании лактата у исследуемых групп. Ранее нами было описано увеличение гиппокампального лактата у животных дикого типа после моделирования болезни Альцгеймера, что мы связывали с когнитивным дефицитом. Известно, что увеличение гиппокампального уровня лактата наблюдается при появлении когнитивного дефицита у мышей с болезнью Альцгеймера в возрасте 12 месяцев [122].

В настоящее время считается, что болезнь Альцгеймера сопровождается гипометаболизмом глюкозы различной степени тяжести в разных областях мозга. Признаки гипометаболизма глюкозы, такие как снижение ее уровня в центральной нервной системе, а также угнетение функций митохондрий, начинаются за несколько десятилетий до появления каких-либо симптомов или гистопатологических изменений. Кроме того, в литературе описано сокращение активности ключевых митохондриальных ферментных комплексов при развитии БА, например снижение активности α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса [209].

Еще одно недавнее исследование продемонстрировало, что, несмотря на прогрессирующее снижение уровня лактата во фронтальной коре с возрастом у C57BL/6 мышей, в гиппокампе уровень лактата не снижается. В совокупности эти наблюдения показывают, что повышение уровня лактата может фактически мешать процессам памяти при БА [122].

Следует особо отметить, что лактат может играть разную роль в здоровом и патологическом мозге. Так повышенная экспрессия ферментов, продуцирующих лактат, коррелирует с улучшением памяти у контрольных мышей. Интересно, что у мышей трансгенных APP/PS1 был обнаружен противоположный эффект. У этих мышей повышенная экспрессия ферментов, продуцирующих лактат, коррелировала с более низкой продуктивностью памяти [122].

Таким образом, несмотря на сходный уровень лактата сложно сделать выводы и нормальном метаболизме глюкозы в миндалине головного мозга различных групп, поскольку экспрессия других маркеров была нарушена.

Также в данном исследовании определили уровень инсулина, поскольку изучение происхождения инсулина в ЦНС остается одним из наиболее актуальных в современной нейронауке и эндокринологии [28]. Большее количество мозгового инсулина вырабатывается на периферии и проходит через гематоэнцефалический барьер через насыщаемый рецептор-опосредованный процесс [45]. Тем не менее, имеются данные о том, что инсулин может также продуцироваться в головном мозге [173]. Увеличенный уровень инсулина в плазме и цереброспинальной жидкости приводит к увеличению A β у людей [96]. Интересно, что такая гиперинсулинемия кроме того приводила к незначительным улучшениям памяти. Основываясь на этих экспериментах и представлении о том, что мозг становится резистентным к инсулину при БА [246], интраназальный инсулин тестируется в клинических испытаниях для лечения БА [259]. Несмотря на то, что эффекты инсулина широко изучены, роль инсулина как патологической молекулы, так и потенциального терапевтической мишени при БА по-прежнему остается слабо изученной [24]. Хотя предыдущие эксперименты имели решающее значение для понимания потенциальных взаимодействий между инсулиновой сигнализацией, центральным инсулином и A β , *in vivo*, механические эксперименты все еще необходимы для определения того, увеличивается ли мозговой инсулин при БА [234].

В данном исследовании не было выявлено статистически значимых различий в концентрации инсулина в миндалевидном теле мышей исследуемых групп. Однако была обнаружена тенденция к увеличению инсулина в миндалевидном теле у мышей дикого типа после инъекции им бета-амилоида 1-42.

Высокий уровень инсулина способствует созреванию белка предшественника амилоида (APP) и приводит к увеличению внеклеточного

A β за счет активации передачи сигналов инсулинового рецептора *in vitro*. У мышей эндогенная нарушенная нейронная инсулиновая сигнализация способствует повышению уровня A β и отложению амилоида *in vivo* [239]. Поскольку деградация как инсулина, так и A β опосредуется инсулин-деградирующим ферментом (IDE), эксперименты *in vitro* показывают, что IDE будет предпочтительно утилизировать инсулин, приводя к более высоким уровням внеклеточного A β , при этом уровень инсулина будет высоким [205]. Инъекция экзогенного A β в мозг крысы для изучения клиренса A β подтверждает, что инъекция инсулина значительно уменьшает клиренс A β [230], однако это не было подтверждено в естественных эндогенных условиях [234].

Последние исследования также демонстрируют, что пациенты с болезнью Альцгеймера могут иметь более низкий уровень протеазы – инсулин-деградирующего фермента [276]. Возможно, подобное заключение и может объяснить тенденцию к увеличению инсулина в миндалевидном теле.

Кроме того, был определен уровень интерлейкина 1 β в миндалевидном теле головного мозга у исследуемых групп. Вместе с тем, следуя логике исследования, делеция *Nlrp3* должна сопровождаться подавлением созревания интерлейкина 1 β . В предыдущих исследованиях при изучении нейродегенерации, сопровождающейся нейровоспалением, были обнаружены маркеры воспаления, такие как цитокины, вокруг бета-амилоидных бляшек, характерных для развития болезни Альцгеймера. Кроме того, было убедительно показано, что при нейровоспалении, сопровождающем развитие болезни Альцгеймера, активируются пути врожденного иммунитета, в том числе Toll-подобные рецепторы и NLRP3 инфламмосомы. Имеются данные, что протофибриллы бета-амилоида непосредственно способствуют формированию и активации инфламмасом [110, 251].

По данным некоторых авторов созревание некоторых цитокинов, таких как IL-1 β , осуществляется инфламмасомами в цитозоле микроглии. Фагоцитоз A β активирует NLRP3 в этих клетках [118], тем самым связывая

интернализацию патологических белков с высвобождением провоспалительных цитокинов при нейродегенеративных заболеваниях. Тем не менее, остается до конца неясной роль IL-1 β в норме и при патологии. Была описана двойная роль IL-1 β : при высвобождении в низких концентрациях и при гомеостатических условиях IL-1 β активирует астроциты для продуцирования BDNF и TNF, а также дополнительного глутамата и лактата, все из которых важны для долговременной консолидации памяти. Goshen и его коллеги продемонстрировали, что физиологические уровни IL-1 β способствуют формированию памяти, так что небольшое увеличение его уровня может даже улучшить память [112]. Однако любое отклонение от этого физиологического диапазона приводит к нарушению формирования памяти.

По всей видимости, базальные уровни провоспалительных цитокинов необходимы для процессов активного нейрогенеза и миграции клеток, что обеспечивает процессы консолидации памяти. Возможная роль NLRP3 инфламмасом в норме и при патологии представлена на рисунке (Рисунок 28).

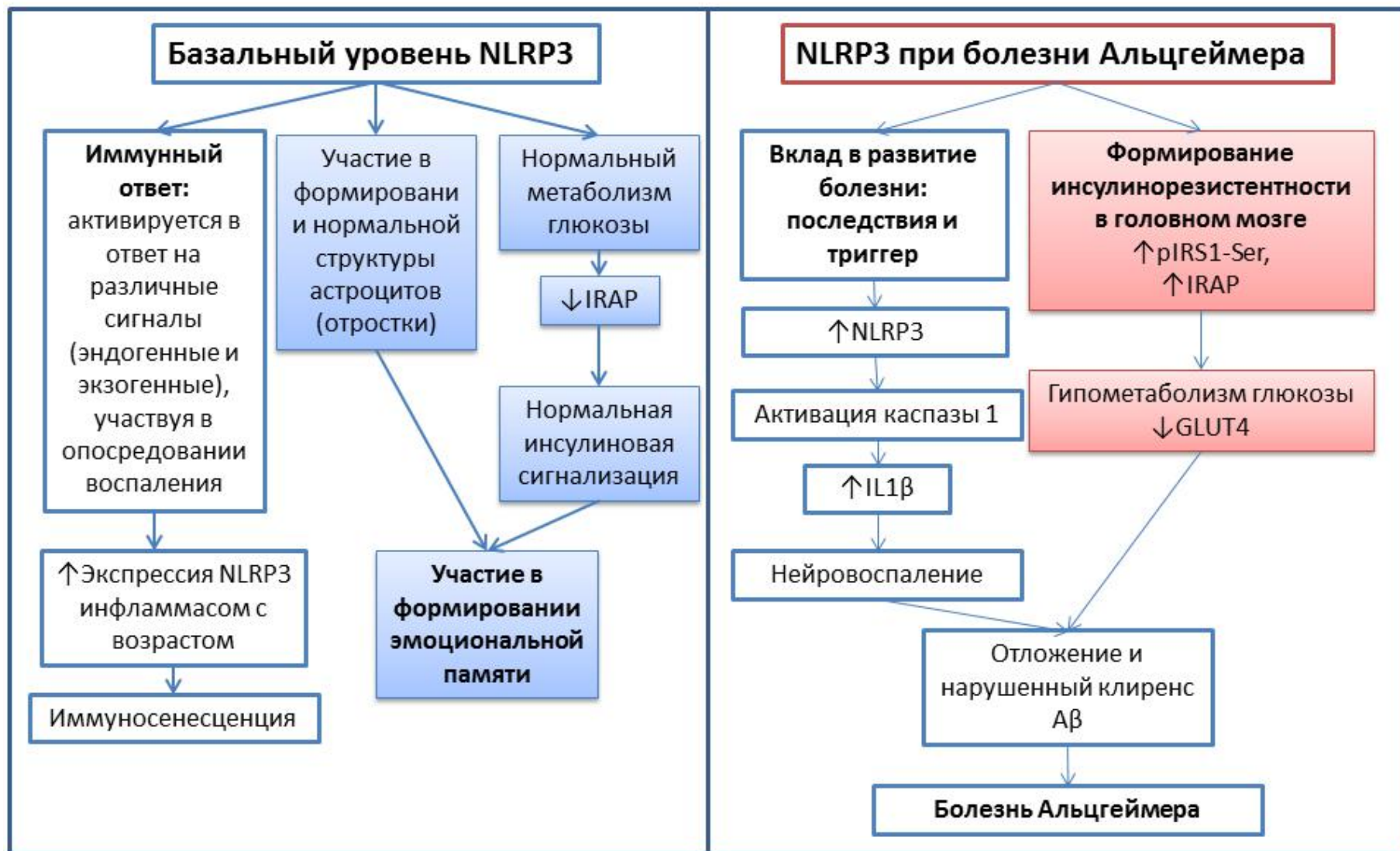


Рисунок 28 – Роль NLRP3 инфламмасом в норме и при болезни Альцгеймера. Выделенные цветом блоки схемы – данные, полученные в ходе данного исследования.

Таким образом, было показано, что развитие воспаления в ткани головного мозга при нейротоксическом действии бета-амилоида связано, по всей видимости, с формированием NLRP3-инфламмасом, гиперпродукцией провоспалительного интерлейкина 1 в миндалинах головного мозга, что в конечном итоге может приводить к нарушению процессов синаптогенеза и нейрогенеза, ассоциированных с репарацией или реализацией когнитивных функций (Рисунок 29).

Полученные данные текущего исследования представлены в итоговой схеме патогенеза развития локальной инсулинорезистентности при БА в эксперименте (Рисунок 30).

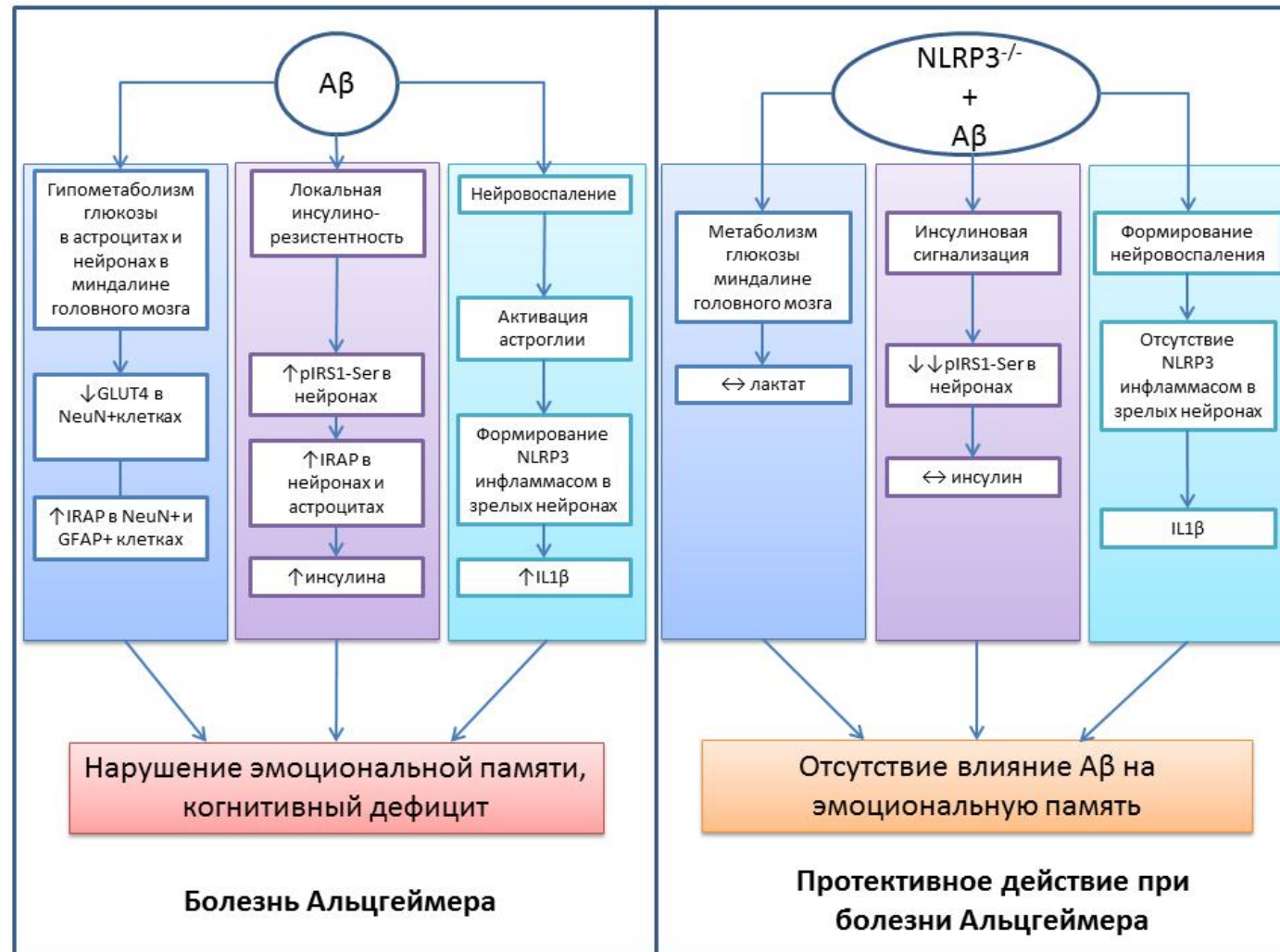


Рисунок 29 – Дополненная схема патогенеза при болезни Альцгеймера, приводящая к нарушению эмоциональной памяти.

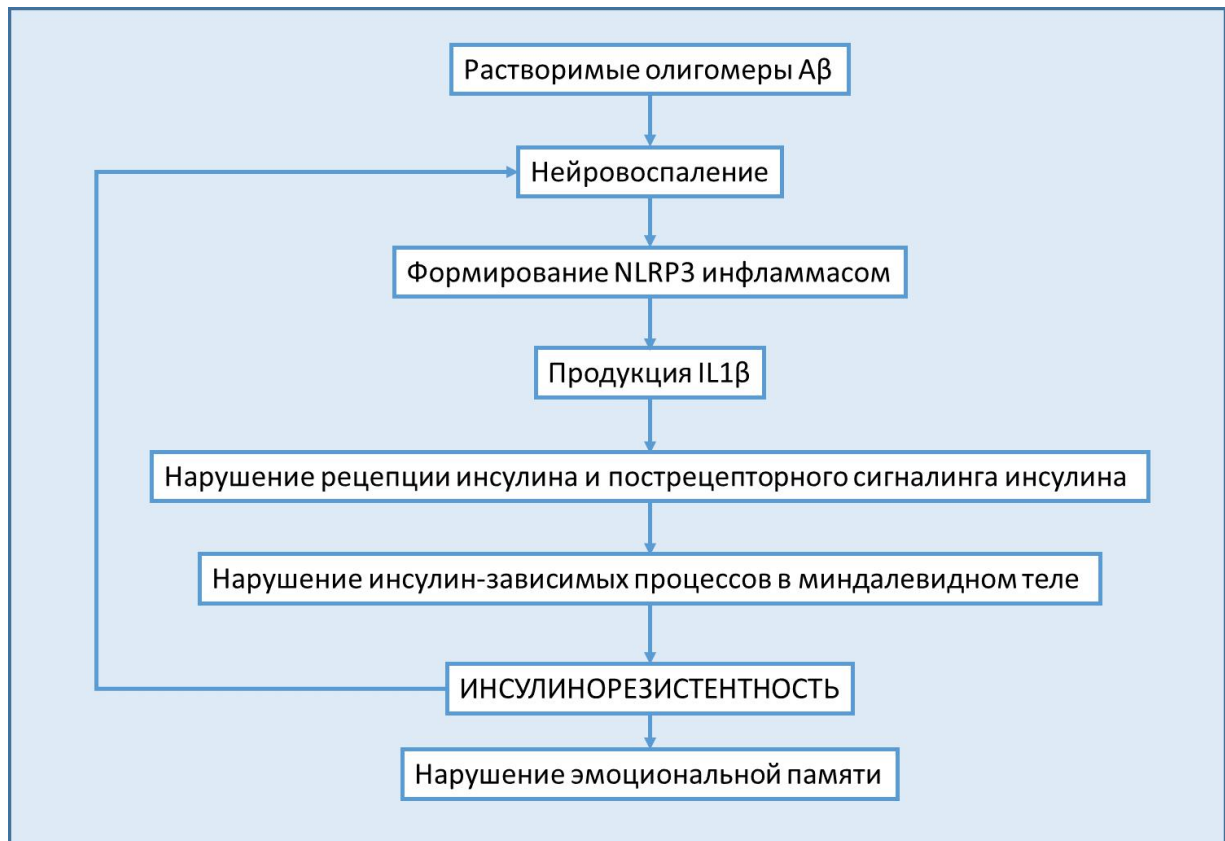


Рисунок 30 – Особенности развития локальной инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера в эксперименте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью экспериментального подхода моделирования болезни Альцгеймера исследованы новые молекулярные механизмы дисрегуляции инсулиновой сигнализации в миндалевидном теле головного мозга во взаимосвязи с процессами нейровоспаления и нарушениями эмоциональной сферы. Установлено, что экспериментальная болезнь Альцгеймера сопровождается нарушением экспрессии и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-опосредованных сигнальных путей и развитием инсулинорезистентности на фоне активации процесса нейровоспаления, в ткани миндалины головного мозга. Этот каскад патологических реакций находит свое отражение в расстройстве эмоционального поведения. Продемонстрированы NLRP3-зависимые механизмы в базолатеральной миндалине головного мозга в норме и при развитии нейродегенерации. Экспериментально доказано, что предотвращение развития локальной инсулинорезистентности за счет блокирования NLRP3 инфламмасом и опосредованного ими нейровоспаления следует считать патогенетически обоснованным подходом к коррекции нарушений эмоциональной сферы при болезни Альцгеймера. 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 А β сопровождается нарушением ассоциативного обучения и запоминания, что проявляется снижением времени замирания в второй контекстный день: после инъекции А 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 А 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 А β приводят к снижению количества клеток, экспрессирующих инсулин-зависимый переносчик глюкозы GLUT4, колокализованного 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 инфламмасомами сопровождается процессы 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 $A\beta$ ($0,42 \pm 0,18$) по сравнению с введением PBS ($0,36 \pm 0,1$) ($p > 0,05$), а также следовым количеством уровня $IL1\beta$ в миндалевидном теле головного мозга в группе с моделированием болезни Альцгеймера и ложной операцией.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БА – Болезнь Альцгеймера

БЛМ – базолатеральная миндалина

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ЦНС – центральная нервная система

A β – бета-амилоид

Akt – протеинкиназа B

APP (Amyloid precursor protein) – белок-предшественник бета-амилоида

AT4 – ангиотензиновые рецепторы 4

CA1 – зона гиппокампа, Аммонов рог

CS (conditioned stimulus) – условный раздражитель

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

DG – зубчатая извилина гиппокампа

ERK1/2 – киназа MAPK сигнального пути, реагирующая на внеклеточные сигналы

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

GFAP – глиальный кислый фибриллярный белок

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

IDE – инсулин-деградирующий фермент

IFN γ – интерферон γ

IGF – инсулиноподобный фактор роста

IKK – IкappaB киназа

IL1 β – интерлейкин 1 β

IR – инсулиновый рецептор, рецептор к инсулину

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

IRS-1,2 – субстраты инсулинового рецептора

JNK – c-Jun N-терминальная киназа

LTP – долговременная потенция

MAPK митоген-активируемая протеинкиназа

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

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PRR – рецепторы паттерн-распознавания

PSEN1,2 – белок пресенилин

TLR – toll-подобные рецепторы

TNF α – фактор некроза опухоли α

US (unconditioned stimulus) – безусловный стимул

WT – мыши дикого типа

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Т.В., Лукив У.Дж., Рогаев Е.И. Биологические основы амилоидоза при болезни Альцгеймера // Биохимия. 2017. № 2 (82). С. 226–246.
2. Боголепова А.Н. Болезнь Альцгеймера и сахарный диабет // Медицинский совет. 2015. № 18. С. 36–40.
3. Васенина Е.Е., Левин О.С. Когнитивные нарушения у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Эффективная фармакотерапия. 2016. № 29. С. 40–47.
4. Власеко А.Г., Morris J.C., Mintun M.A. Регионарная характеристика накопления бета-амилоида на доклинической и клинической стадиях болезни Альцгеймера // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2010. № 4 (4). С. 10–14.
5. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Инфламмасомы и воспаление // Российский иммунологический журнал. 2017. № 4 (11(20)). С. 620–626.
6. Горина Я.В. [и др.]. Нейровоспаление и инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера // Сибирское медицинское обозрение. 2014. № 4. С. 11–19.
7. Горина Я.В. [и др.]. Анализ пространственной памяти у NLRP3-нокаутных животных // Сибирское медицинское обозрение. 2017. № 6. С. 50–56.
8. Горина Я.В. [и др.]. Особенности экспрессии молекул-маркеров инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера // Проблемы эндокринологии. № 61 (4). С. 43–48.
9. Горина Я.В. [и др.]. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте // Успехи геронтологии. (1). С. 49–55.

10. Григорьев Е.В. [и др.]. Нейровоспаление в критических состояниях: механизмы и протективная роль гипотермии // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2016. № 3 (1). С. 88–96.

11. Калын Я.Б., Гаврилова С.И., Михайлова И.М. Фармакоэкономические аспекты болезни Альцгеймера // *Современная терапия в психиатрии и неврологии*. 2014. № 2. С. 10–15.

12. Коберская Н.Н. Болезнь Альцгеймера: новые критерии диагностики и терапевтические аспекты в зависимости от стадии болезни // *Медицинский совет*. 2017. № 10. С. 18–24.

13. Мальцев А.В. [и др.]. Интенсивный синтез белка в нейронах и фосфорилирование белка предшественника бета-амилоида и тау-белка являются пусковыми факторами амилоидоза нейронов и болезни Альцгеймера // *Биомедицинская химия*. 2013. № 2 (59). С. 144–170.

14. Матвеева М.В. [и др.]. Таупатия и когнитивные нарушения при экспериментальном сахарном диабете // *Сахарный диабет*. 2017. № 3 (20). С. 181–184.

15. Нестерова М.В. Актуальные аспекты диагностики и лечения болезни Альцгеймера на основе современных зарубежных рекомендаций // *Медицинский совет*. 2018. № 6. С. 33–37.

16. Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф. Роль инфламмасом в патогенезе социально-значимых заболеваний человека // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018. № 1 (62). С. 77–89.

17. Пирузян Л.А., Лексина Л.А. Переходы от физиологических показателей к патофизиологическим на примере амилоидоза при периодической болезни, инсулиннезависимом сахарном диабете и болезни Альцгеймера // *Физиология человека*. 2009. № 1 (35). С. 107–120.

18. Родин Д.И., Шварцман А.Л., Саранцева С.В. Современные подходы к терапии при болезни Альцгеймера: от амилоида к поиску новых мишеней // *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. 2014. № 1 (21). С. 6–10.

19. Салмина А.Б. [и др.]. Воспаление и старение мозга // Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. № 1. С. 17–25.
20. Салмина А.Б., Язуина Н.А. Инсулин и инсулинорезистентность: новые молекулы-маркеры и молекулы-мишени для диагностики и терапии заболеваний центральной нервной системы // Бюллетень сибирской медицины. 2013. № 5 (12). С. 104–118.
21. Ставровская А.В. [и др.]. Оценка эффектов новых пептидных соединений у экспериментальных животных с токсическими моделями болезни Альцгеймера // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2016. № 2 (10). С. 33–41.
22. Стефанова Н.А., Колосова Н.Г. Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2016. № 1. С. 6–13.
23. Суркова Е.В. Сахарный диабет и центральная нервная система // Терапевтический архив. 2016. № 10 (88). С. 82–86.
24. Сухов И.Б. [и др.]. Функциональное состояние гипоталамических сигнальных систем у крыс с сахарным диабетом 2-го типа, леченных интраназальным инсулином // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2016. № 3 (52). С. 184–194.
25. Угрюмов М.В. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Угрюмов М.В., Москва: Научный мир, 2014. 848 с.
26. Черных А.И. [и др.]. Провоспалительный фенотип периваскулярной астроглии и CD133+ клеток-предшественников эндотелиоцитов при моделировании болезни Альцгеймера у мышей // Фундаментальная и клиническая медицина. 2018. № 1 (3). С. 6–15.
27. Шпаков А.О. Функциональная активность инсулиновой сигнальной системы мозга в норме и при сахарном диабете 2-го типа // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2015. № 10 (101). С. 1103–1127.

28. Шпаков А.О., Деркач К.В. Гормональные системы мозга и сахарный диабет 2-го типа / Шпаков А.О., Деркач К.В., Санкт-Петербург: Издательство Политехнического университета, 2015. 252 с.

29. Agrawal R. [и др.]. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model // *European Neuropsychopharmacology*. 2011. № 3 (21). С. 261–273.

30. Ahn K.-C. [и др.]. Characterization of Impaired Cerebrovascular Structure in APP/PS1 Mouse Brains // *Neuroscience*. 2018.

31. Akash M.S.H., Rehman K., Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013. № 3 (114). С. 525–531.

32. Albiston A.L. [и др.]. Evidence That the Angiotensin IV (AT_4) Receptor Is the Enzyme Insulin-regulated Aminopeptidase // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. № 52 (276). С. 48623–48626.

33. Albiston A.L. [и др.]. Identification and characterization of a new cognitive enhancer based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase // *The FASEB Journal*. 2008. № 12 (22). С. 4209–4217.

34. Albiston A.L. [и др.]. Gene knockout of insulin-regulated aminopeptidase: Loss of the specific binding site for angiotensin IV and age-related deficit in spatial memory // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2010. № 1 (93). С. 19–30.

35. Albiston A.L. [и др.]. Identification and development of specific inhibitors for insulin-regulated aminopeptidase as a new class of cognitive enhancers: Novel IRAP inhibitors // *British Journal of Pharmacology*. 2011. № 1 (164). С. 37–47.

36. Alzheimer's Association Alzheimers Dement. Alzheimer's Disease Facts and Figures. 2017.

37. Amy C. [и др.]. Long-Acting Intranasal Insulin Detemir Improves Cognition for Adults with Mild Cognitive Impairment or Early-Stage

Alzheimer's Disease Dementia // Journal of Alzheimer's Disease. 2015. № 3. С. 897–906.

38. Anand R., Gill K.D., Mahdi A.A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future // Neuropharmacology. 2014. (76). С. 27–50.

39. Andreasen N., Blennow K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease // Clinical Neurology and Neurosurgery. 2005. № 3 (107). С. 165–173.

40. Areias M.F.C., Prada P.O. Mechanisms of insulin resistance in the amygdala: Influences on food intake // Behavioural Brain Research. 2015. (282). С. 209–217.

41. Arruda A.P. [и др.]. Low-Grade Hypothalamic Inflammation Leads to Defective Thermogenesis, Insulin Resistance, and Impaired Insulin Secretion // Endocrinology. 2011. № 4 (152). С. 1314–1326.

42. Assmann T.S. [и др.]. Toll-like receptor 3 (TLR3) and the development of type 1 diabetes mellitus // Archives of Endocrinology and Metabolism. 2015. № 1 (59). С. 4–12.

43. Baker L.D. [и др.]. Insulin Resistance and Alzheimer-like Reductions in Regional Cerebral Glucose Metabolism for Cognitively Normal Adults With Prediabetes or Early Type 2 Diabetes // Archives of Neurology. 2011. № 1 (68).

44. Balducci C. [и др.]. Synthetic amyloid- oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. № 5 (107). С. 2295–2300.

45. Banks W.A. The source of cerebral insulin // European Journal of Pharmacology. 2004. № 1–3 (490). С. 5–12.

46. Banks W.A., Owen J.B., Erickson M.A. Insulin in the brain: There and back again // Pharmacology & Therapeutics. 2012. № 1 (136). С. 82–93.

47. Baumeier C. [и др.]. Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease // Molecular Metabolism. 2017. № 10 (6). С. 1254–1263.

48. Bélanger M., Allaman I., Magistretti P.J. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation // *Cell Metabolism*. 2011. № 6 (14). С. 724–738.
49. Benilova I., Karran E., De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes // *Nature Neuroscience*. 2012. № 3 (15). С. 349–357.
50. Bergsbaken T., Fink S.L., Cookson B.T. Pyroptosis: host cell death and inflammation // *Nature Reviews Microbiology*. 2009. № 2 (7). С. 99–109.
51. Bernstein H.-G. [и др.]. 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 // *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2017. № 5 (267). С. 427–443.
52. Biessels G.J. [и др.]. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions // *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2014. № 3 (2). С. 246–255.
53. Bingham E.M. [и др.]. The Role of Insulin in Human Brain Glucose Metabolism: An 18Fluoro-Deoxyglucose Positron Emission Tomography Study // *Diabetes*. 2002. № 12 (51). С. 3384–3390.
54. Blázquez E. [и др.]. Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease // *Frontiers in Endocrinology*. 2014. (5).
55. Bomfim T.R. [и др.]. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers // *Journal of Clinical Investigation*. 2012. № 4 (122). С. 1339–1353.
56. Bouças A.P. [и др.]. The role of interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) in the development of type 1 diabetes mellitus // *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia*. 2013. № 9 (57). С. 667–676.

57. Boura-Halfon S., Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009. № 4 (296). С. E581–E591.
58. Boury-Jamot B. [и др.]. Disrupting astrocyte–neuron lactate transfer persistently reduces conditioned responses to cocaine // *Molecular Psychiatry*. 2016. № 8 (21). С. 1070–1076.
59. Boutens L., Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity // *Diabetologia*. 2016. № 5 (59). С. 879–894.
60. Boutrel B., Magistretti P.J. A Role for Lactate in the Consolidation of Drug-Related Associative Memories // *Biological Psychiatry*. 2016. № 11 (79). С. 875–877.
61. Bowie C.R., Harvey P.D. Administration and interpretation of the Trail Making Test // *Nature Protocols*. 2006. № 5 (1). С. 2277–2281.
62. Braak H. [и др.]. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry // *Acta Neuropathologica*. 2006. № 4 (112). С. 389–404.
63. Chaaya N., Battle A.R., Johnson L.R. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2018. (92). С. 43–54.
64. Chai S. [и др.]. Development of cognitive enhancers based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase // *BMC Neuroscience*. 2008. № Suppl 2 (9). С. S14.
65. Chambon C. [и др.]. Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid- β peptides in rodents // *Behavioural Brain Research*. 2011. № 2 (225). С. 623–641.
66. Chen Y., Lippincott-Schwartz J. Insulin triggers surface-directed trafficking of sequestered GLUT4 storage vesicles marked by Rab10 // *Small GTPases*. 2013. № 3 (4). С. 193–197.

67. Chen Z., Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies // *Progress in Neurobiology*. 2013. (108). C. 21–43.

68. Cheng G. [и др.]. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies: Diabetes and cognitive function // *Internal Medicine Journal*. 2012. № 5 (42). C. 484–491.

69. Cholerton B., Baker L.D., Craft S. Insulin resistance and pathological brain ageing: Insulin resistance and brain ageing // *Diabetic Medicine*. 2011. № 12 (28). C. 1463–1475.

70. Christensen R. [и др.]. A β (1–42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT_{2A} levels // *Experimental Neurology*. 2008. № 1 (210). C. 164–171.

71. Craft S. Insulin resistance and AD—extending the translational path: Alzheimer disease // *Nature Reviews Neurology*. 2012. № 7 (8). C. 360–362.

72. Crane P.K. [и др.]. Glucose Levels and Risk of Dementia // *New England Journal of Medicine*. 2013. № 6 (369). C. 540–548.

73. Dal Prà I. [и др.]. Do Astrocytes Collaborate with Neurons in Spreading the “Infectious” A β and Tau Drivers of Alzheimer's Disease? // *The Neuroscientist*. 2015. № 1 (21). C. 9–29.

74. Daniels M.J.D. [и др.]. Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models // *Nature Communications*. 2016. (7). C. 12504.

75. Datta S., Chakrabarti N. Age related rise in lactate and its correlation with lactate dehydrogenase (LDH) status in post-mitochondrial fractions isolated from different regions of brain in mice // *Neurochemistry International*. 2018. (118). C. 23–33.

76. Davis B.K., Wen H., Ting J.P.-Y. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases // *Annual Review of Immunology*. 2011. № 1 (29). C. 707–735.

77. De Felice F.G. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications // *Journal of Clinical Investigation*. 2013. № 2 (123). C. 531–539.

78. De Felice F.G., Ferreira S.T. Inflammation, Defective Insulin Signaling, and Mitochondrial Dysfunction as Common Molecular Denominators Connecting Type 2 Diabetes to Alzheimer Disease // *Diabetes*. 2014. № 7 (63). C. 2262–2272.

79. De Felice F.G., Lourenco M.V. Brain metabolic stress and neuroinflammation at the basis of cognitive impairment in Alzheimer's disease // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2015. (7).

80. DeFronzo R.A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009 // *Diabetologia*. 2010. № 7 (53). C. 1270–1287.

81. Di Paolo G., Kim T.-W. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond // *Nature Reviews Neuroscience*. 2011. № 5 (12). C. 284–296.

82. Di Virgilio F. The Therapeutic Potential of Modifying Inflammasomes and NOD-Like Receptors // *Pharmacological Reviews*. 2013. № 3 (65). C. 872–905.

83. Diggs-Andrews K.A. [и др.]. Brain Insulin Action Regulates Hypothalamic Glucose Sensing and the Counterregulatory Response to Hypoglycemia // *Diabetes*. 2010. № 9 (59). C. 2271–2280.

84. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease // *Nature Reviews Immunology*. 2011. № 2 (11). C. 98–107.

85. Doyle S., Ozaki E., Campbell M. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives // *Journal of Inflammation Research*. 2015. C. 15.

86. Drago V. [и др.]. Emotional Indifference in Alzheimer's Disease // *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 2010. № 2 (22). C. 236–242.

87. Eisenbarth S.C., Flavell R.A. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome: Adaptive Immunity and the Inflammasome // *EMBO Molecular Medicine*. 2009. № 2 (1). С. 92–98.

88. Epelbaum S. [и др.]. Acute amnestic encephalopathy in amyloid- β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo // *Neurobiology of Aging*. 2015. № 6 (36). С. 2043–2052.

89. Erickson M.A., Dohi K., Banks W.A. Neuroinflammation: A Common Pathway in CNS Diseases as Mediated at the Blood-Brain Barrier // *Neuroimmunomodulation*. 2012. № 2 (19). С. 121–130.

90. Faucher P. [и др.]. Hippocampal Injections of Oligomeric Amyloid β -peptide (1–42) Induce Selective Working Memory Deficits and Long-lasting Alterations of ERK Signaling Pathway // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2016. (7).

91. Fernando R.N. [и др.]. Distribution and cellular localization of insulin-regulated aminopeptidase in the rat central nervous system // *The Journal of Comparative Neurology*. 2005. № 4 (487). С. 372–390.

92. 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? // *European Journal of Neuroscience*. 2008. № 3 (28). С. 588–598.

93. Ferreira S.T. [и др.]. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia*. 2014. № 1 (10). С. S76–S83.

94. Ferreira S.T. [и др.]. Soluble amyloid- β^2 oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015. (9).

95. Ferretti M.T., Cuello A.C. Does a pro-inflammatory process precede Alzheimer's disease and mild cognitive impairment? // *Current Alzheimer Research*. 2011. № 2 (8). С. 164–174.

96. Fishel M.A. [и др.]. Hyperinsulinemia Provokes Synchronous Increases in Central Inflammation and β -Amyloid in Normal Adults // Archives of Neurology. 2005. № 10 (62).
97. Fitch T. [и др.]. Force transducer-based movement detection in fear conditioning in mice: A comparative analysis // Hippocampus. 2002. № 1 (12). С. 4–17.
98. Freir D.B. [и др.]. A β oligomers inhibit synapse remodelling necessary for memory consolidation // Neurobiology of Aging. 2011. № 12 (32). С. 2211–2218.
99. Frozza R.L., Lourenco M.V., De Felice F.G. Challenges for Alzheimer's Disease Therapy: Insights from Novel Mechanisms Beyond Memory Defects // Frontiers in Neuroscience. 2018. (12).
100. Gandy S. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease // Journal of Clinical Investigation. 2005. № 5 (115). С. 1121–1129.
101. García-Cáceres C. [и др.]. Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability // Cell. 2016. № 4 (166). С. 867–880.
102. Gard P.R. [и др.]. Changes of renin-angiotensin system-related aminopeptidases in early stage Alzheimer's disease // Experimental Gerontology. 2017. (89). С. 1–7.
103. Garwood C.J. [и др.]. Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors // Molecular Brain. 2015. № 1 (8).
104. Georganopoulou D.G. [и др.]. From The Cover: Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. № 7 (102). С. 2273–2276.
105. Ghasemi R. [и др.]. Insulin in the Brain: Sources, Localization and Functions // Molecular Neurobiology. 2013. № 1 (47). С. 145–171.

106. Ghasemi R. [и др.]. Repeated intra-hippocampal injection of beta-amyloid 25–35 induces a reproducible impairment of learning and memory: Considering caspase-3 and MAPKs activity // *European Journal of Pharmacology*. 2014. (726). С. 33–40.

107. Gibbs M.E., Anderson D.G., Hertz L. Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens // *Glia*. 2006. № 3 (54). С. 214–222.

108. Girardot T. [и др.]. Intra-cellular lactate concentration in T lymphocytes from septic shock patients — a pilot study // *Intensive Care Medicine Experimental*. 2018. № 1 (6).

109. Glenner G.G. Reprint of “Alzheimer’s disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein” // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. № 3 (425). С. 534–539.

110. Goldmann T., Tay T.L., Prinz M. Love and death: microglia, NLRP3 and the Alzheimer’s brain // *Cell Research*. 2013. № 5 (23). С. 595–596.

111. Goshen I. [и др.]. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes // *Psychoneuroendocrinology*. 2007. № 8–10 (32). С. 1106–1115.

112. Goshen I., Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2009. № 1 (30). С. 30–45.

113. Granic I. [и др.]. LPYFDa Neutralizes Amyloid- β -Induced Memory Impairment and Toxicity // *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2010. № 3 (19). С. 991–1005.

114. Greenwood C.E., Winocur G. Glucose Treatment Reduces Memory Deficits in Young Adult Rats Fed High-Fat Diets // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2001. № 2 (75). С. 179–189.

115. Guo H., Callaway J.B., Ting J.P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics // *Nature Medicine*. 2015. № 7 (21). С. 677–687.

116. Gustin A. [и др.]. NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes // PLOS ONE. 2015. № 6 (10). С. e0130624.

117. Hall J., Thomas K.L., Everitt B.J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 2001. № 6 (21). С. 2186–2193.

118. Halle A. [и др.]. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β // Nature Immunology. 2008. № 8 (9). С. 857–865.

119. Haneklaus M., O'Neill L.A.J. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation // Immunological Reviews. 2015. № 1 (265). С. 53–62.

120. Hardy J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics // Science. 2002. № 5580 (297). С. 353–356.

121. Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal: Amyloid hypothesis for Alzheimer's disease // Journal of Neurochemistry. 2009. № 4 (110). С. 1129–1134.

122. Harris R.A. [и др.]. Aerobic Glycolysis in the Frontal Cortex Correlates with Memory Performance in Wild-Type Mice But Not the APP/PS1 Mouse Model of Cerebral Amyloidosis // Journal of Neuroscience. 2016. № 6 (36). С. 1871–1878.

123. Hartmann S. [и др.]. β -Secretase BACE1 Promotes Surface Expression and Function of Kv3.4 at Hippocampal Mossy Fiber Synapses // The Journal of Neuroscience. 2018. № 14 (38). С. 3480–3494.

124. Havrankova J., Roth J., Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat // Nature. 1978. № 5656 (272). С. 827–829.

125. Heneka M.T. [и др.]. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease // Journal of Neural Transmission. 2010. № 8 (117). С. 919–947.

126. Heneka M.T. [и др.]. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice // *Nature*. 2012. № 7434 (493). С. 674–678.
127. Hermans S.J. [и др.]. Crystal structure of human insulin-regulated aminopeptidase with specificity for cyclic peptides: Structure of Insulin-Regulated Aminopeptidase // *Protein Science*. 2015. № 2 (24). С. 190–199.
128. Hirosumi J. [и др.]. A central role for JNK in obesity and insulin resistance // *Nature*. 2002. № 6913 (420). С. 333–336.
129. Hirvonen J. [и др.]. Effects of Insulin on Brain Glucose Metabolism in Impaired Glucose Tolerance // *Diabetes*. 2011. № 2 (60). С. 443–447.
130. Ho L. [и др.]. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // *The FASEB Journal*. 2004. № 7 (18). С. 902–904.
131. Hoefer M. [и др.]. Fear conditioning in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease // *Brain*. 2008. № 6 (131). С. 1646–1657.
132. Holtzman D.M., Morris J.C., Goate A.M. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century // *Science Translational Medicine*. 2011. № 77 (3). С. 77sr1-77sr1.
133. Hong S. [и др.]. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models // *Science*. 2016. № 6286 (352). С. 712–716.
134. Ismail M.-A.-M. [и др.]. 27-Hydroxycholesterol impairs neuronal glucose uptake through an IRAP/GLUT4 system dysregulation // *The Journal of Experimental Medicine*. 2017. С. jem.20160534.
135. Jack C.R. Evidence for Ordering of Alzheimer Disease Biomarkers // *Archives of Neurology*. 2011. № 12 (68). С. 1526.
136. Jager J. [и др.]. Interleukin-1 β -Induced Insulin Resistance in Adipocytes through Down-Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression // *Endocrinology*. 2007. № 1 (148). С. 241–251.
137. Janak P.H., Tye K.M. From circuits to behaviour in the amygdala // *Nature*. 2015. № 7534 (517). С. 284–292.

138. Jordens I. [и др.]. Insulin-regulated Aminopeptidase Is a Key Regulator of GLUT4 Trafficking by Controlling the Sorting of GLUT4 from Endosomes to Specialized Insulin-regulated Vesicles // *Molecular Biology of the Cell*. 2010. № 12 (21). С. 2034–2044.
139. Kang L. [и др.]. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons // *Diabetes*. 2004. № 3 (53). С. 549–559.
140. Kaushal V. [и др.]. Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation // *Cell Death & Differentiation*. 2015. № 10 (22). С. 1676–1686.
141. Kaye R. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis // *Science*. 2003. № 5618 (300). С. 486–489.
142. Keeney J.T.-R., Ibrahimi S., Zhao L. Human ApoE Isoforms Differentially Modulate Glucose and Amyloid Metabolic Pathways in Female Brain: Evidence of the Mechanism of Neuroprotection by ApoE2 and Implications for Alzheimer's Disease Prevention and Early Intervention // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. № 2 (48). С. 411–424.
143. Kern W. [и др.]. Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans // *Neuroendocrinology*. 2001. № 4 (74). С. 270–280.
144. Kerti L. [и др.]. Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure // *Neurology*. 2013. № 20 (81). С. 1746–1752.
145. Kim B. [и др.]. Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPK ^{Ser-485} Phosphorylation // *Journal of Biological Chemistry*. 2015. № 31 (290). С. 19146–19157.
146. Kim J.J., Jung M.W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2006. № 2 (30). С. 188–202.

147. Kitamura T. [и др.]. Adult Neurogenesis Modulates the Hippocampus-Dependent Period of Associative Fear Memory // *Cell*. 2009. № 4 (139). С. 814–827.
148. Kittelberger K.A. [и др.]. Natural Amyloid-Beta Oligomers Acutely Impair the Formation of a Contextual Fear Memory in Mice // *PLoS ONE*. 2012. № 1 (7). С. e29940.
149. Kleinridders A. [и др.]. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function // *Diabetes*. 2014. № 7 (63). С. 2232–2243.
150. Kochli D.E. [и др.]. The amygdala is critical for trace, delay, and contextual fear conditioning // *Learning & Memory*. 2015. № 2 (22). С. 92–100.
151. Kokubo H. [и др.]. Soluble A β oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain // *Brain Research*. 2005. № 2 (1031). С. 222–228.
152. Komleva Y.K. [и др.]. Expression of inflammasome in neuronal and astrocytic cells in neurodegeneration Goettingen: Neurowissenschaftliche, 2015.
153. Kuperstein I. [и др.]. Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio // *The EMBO Journal*. 2010. № 19 (29). С. 3408–3420.
154. Kurz A., Perneczky R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2011. № 2 (35). С. 373–379.
155. LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease // *Nature Reviews Neuroscience*. 2007. № 7 (8). С. 499–509.
156. Laurent C., Buée L., Blum D. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? // *Biomedical Journal*. 2018. № 1 (41). С. 21–33.
157. Ledo J.H. [и др.]. Cross Talk Between Brain Innate Immunity and Serotonin Signaling Underlies Depressive-Like Behavior Induced by Alzheimer's Amyloid- Oligomers in Mice // *Journal of Neuroscience*. 2016. № 48 (36). С. 12106–12116.

158. Lee B.-C., Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014. № 3 (1842). С. 446–462.
159. Lee H.-M. [и др.]. Upregulated NLRP3 Inflammasome Activation in Patients With Type 2 Diabetes // *Diabetes*. 2013. № 1 (62). С. 194–204.
160. Leto D., Saltiel A.R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012. № 6 (13). С. 383–396.
161. Lew R.A. [и др.]. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP): AT4 ligands are inhibitors of IRAP // *Journal of Neurochemistry*. 2004. № 2 (86). С. 344–350.
162. Li R. [и др.]. Apigenin ameliorates chronic mild stress-induced depressive behavior by inhibiting interleukin-1 β production and NLRP3 inflammasome activation in the rat brain // *Behavioural Brain Research*. 2016. (296). С. 318–325.
163. Liu Y. [и др.]. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes // *The Journal of Pathology*. 2011. № 1 (225). С. 54–62.
164. Lourenco M.V. [и др.]. TNF- α Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's β -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys // *Cell Metabolism*. 2013. № 6 (18). С. 831–843.
165. Luchsinger J.A. [и др.]. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease // *Neurology*. 2004. № 7 (63). С. 1187–1192.
166. Ly P.T.T., Cai F., Song W. Detection of Neuritic Plaques in Alzheimer's Disease Mouse Model // *Journal of Visualized Experiments*. 2011. № 53.
167. Magistretti P.J., Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule // *Nature Reviews Neuroscience*. 2018. № 4 (19). С. 235–249.

168. Majlessi N. [и др.]. Amelioration of Amyloid β -Induced Cognitive Deficits by *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil in a Rat Model of Alzheimer's Disease: Antiamyloid Effects of *Zataria multiflora* in Rats // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2012. № 4 (18). С. 295–301.
169. Maren S., Holmes A. Stress and Fear Extinction // *Neuropsychopharmacology*. 2016. № 1 (41). С. 58–79.
170. Marques M.A. [и др.]. Peripheral Amyloid- β Levels Regulate Amyloid- β Clearance from the Central Nervous System // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2009. № 2 (16). С. 325–329.
171. Masters S.L. Specific inflammasomes in complex diseases // *Clinical Immunology*. 2013. № 3 (147). С. 223–228.
172. Matsumura S. [и др.]. Two Distinct Amyloid β -Protein (A β) Assembly Pathways Leading to Oligomers and Fibrils Identified by Combined Fluorescence Correlation Spectroscopy, Morphology, and Toxicity Analyses // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. № 13 (286). С. 11555–11562.
173. Mehran A.E. [и др.]. Hyperinsulinemia Drives Diet-Induced Obesity Independently of Brain Insulin Production // *Cell Metabolism*. 2012. № 6 (16). С. 723–737.
174. Milanski M. [и др.]. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity // *Journal of Neuroscience*. 2009. № 2 (29). С. 359–370.
175. Molina J.A. [и др.]. Cerebrospinal fluid levels of insulin in patients with Alzheimer's disease // *Acta Neurologica Scandinavica*. 2002. № 6 (106). С. 347–350.
176. Moloney A.M. [и др.]. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling // *Neurobiology of Aging*. 2010. № 2 (31). С. 224–243.

177. Monte S.M. de la Relationships Between Diabetes and Cognitive Impairment // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2014. № 1 (43). С. 245–267.
178. Moore A.H. [и др.]. Sustained expression of interleukin-1beta in mouse hippocampus impairs spatial memory // *Neuroscience*. 2009. № 4 (164). С. 1484–1495.
179. Morimura N. [и др.]. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrfr2/SALM1*-deficient mice // *Nature Communications*. 2017. (8). С. 15800.
180. Mucke L., Selkoe D.J. Neurotoxicity of Amyloid -Protein: Synaptic and Network Dysfunction // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 7 (2). С. a006338–a006338.
181. Müller S. [и др.]. Some notes on insulin-regulated aminopeptidase in depression // *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2013. № 08 (16). С. 1877–1878.
182. Muniyappa R. [и др.]. Cardiovascular Actions of Insulin // *Endocrine Reviews*. 2007. № 5 (28). С. 463–491.
183. Nakamura T. [и др.]. Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis // *Cell*. 2010. № 3 (140). С. 338–348.
184. Naylor M.D. [и др.]. Advancing Alzheimer's disease diagnosis, treatment, and care: Recommendations from the Ware Invitational Summit // *Alzheimer's & Dementia*. 2012. № 5 (8). С. 445–452.
185. Neth B.J., Craft S. Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017. (9).
186. Neumann K. [и др.]. Insulin Resistance and Alzheimers Disease: Molecular Links & Clinical Implications // *Current Alzheimer Research*. 2008. № 5 (5). С. 438–447.

187. Newman L.A., Korol D.L., Gold P.E. Lactate Produced by Glycogenolysis in Astrocytes Regulates Memory Processing // PLoS ONE. 2011. № 12 (6). C. e28427.
188. Nishimoto S. [и др.]. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance // Science Advances. 2016. № 3 (2). C. e1501332–e1501332.
189. Nordberg A. Amyloid imaging in Alzheimer's disease // Neuropsychologia. 2008. № 6 (46). C. 1636–1641.
190. Nordberg A. [и др.]. The use of PET in Alzheimer disease // Nature Reviews Neurology. 2010. № 2 (6). C. 78–87.
191. Oguchi T. [и др.]. Cilostazol Suppresses A β -induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells through Inhibition of Oxidative Stress and MAPK Signaling Pathway // Frontiers in Aging Neuroscience. 2017. (9).
192. Osborn O. [и др.]. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity // Cytokine. 2008. № 1 (44). C. 141–148.
193. O'Shea S. [и др.]. Intracerebroventricular Administration of Amyloid β -protein Oligomers Selectively Increases Dorsal Hippocampal Dialysate Glutamate Levels in the Awake Rat // Sensors. 2008. № 11 (8). C. 7428–7437.
194. Pan Y. [и др.]. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats // Brain, Behavior, and Immunity. 2014. (41). C. 90–100.
195. Patel S. Inflammasomes, the cardinal pathology mediators are activated by pathogens, allergens and mutagens: A critical review with focus on NLRP3 // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017. (92). C. 819–825.
196. Paxinos G, Franklin K The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates / Paxinos G, Franklin K, 4-е изд., Academic Press, 2012. 360 с.
197. Pearson-Leary J. [и др.]. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4 // Behavioural Brain Research. 2018. (338). C. 32–39.

198. Pearson-Leary J., McNay E.C. Intrahippocampal Administration of Amyloid- β 1-42 Oligomers Acutely Impairs Spatial Working Memory, Insulin Signaling, and Hippocampal Metabolism // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. № 2 (30). С. 413–422.
199. Peck G.R. [и др.]. Interaction of the Akt Substrate, AS160, with the Glucose Transporter 4 Vesicle Marker Protein, Insulin-Regulated Aminopeptidase // *Molecular Endocrinology*. 2006. № 10 (20). С. 2576–2583.
200. Perry V.H., Nicoll J.A.R., Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease // *Nature Reviews Neurology*. 2010. № 4 (6). С. 193–201.
201. Piroli G.G. [и др.]. Corticosterone Impairs Insulin-Stimulated Translocation of GLUT4 in the Rat Hippocampus // *Neuroendocrinology*. 2007. № 2 (85). С. 71–80.
202. Poulin S.P. [и др.]. Amygdala atrophy is prominent in early Alzheimer's disease and relates to symptom severity // *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2011. № 1 (194). С. 7–13.
203. Poulos A.M. [и др.]. Compensation in the neural circuitry of fear conditioning awakens learning circuits in the bed nuclei of the stria terminalis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. № 33 (107). С. 14881–14886.
204. Profenno L.A., Porsteinsson A.P., Faraone S.V. Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders // *Biological Psychiatry*. 2010. № 6 (67). С. 505–512.
205. Qiu W.Q. [и др.]. Insulin-degrading Enzyme Regulates Extracellular Levels of Amyloid β -Protein by Degradation // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. № 49 (273). С. 32730–32738.
206. Reagan L.P. [и др.]. Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. № 5 (98). С. 2820–2825.
207. Reaven G.M. The insulin resistance syndrome // *Current Atherosclerosis Reports*. 2003. № 5 (5). С. 364–371.

208. Reed M.N. [и др.]. Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived A β oligomers // *Neurobiology of Aging*. 2011. № 10 (32). С. 1784–1794.
209. Reiman E.M. [и др.]. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 1 (101). С. 284–289.
210. Reno C.M. [и др.]. Brain GLUT4 Knockout Mice Have Impaired Glucose Tolerance, Decreased Insulin Sensitivity, and Impaired Hypoglycemic Counterregulation // *Diabetes*. 2017. № 3 (66). С. 587–597.
211. Rey A. del [и др.]. A cytokine network involving brain-borne IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNF α operates during long-term potentiation and learning // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013. (33). С. 15–23.
212. Rheinheimer J. [и др.]. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review // *Metabolism*. 2017. (74). С. 1–9.
213. Rivera E.J. [и др.]. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2005. № 3 (8). С. 247–268.
214. Roh J.H. [и др.]. Volume reduction in subcortical regions according to severity of Alzheimer's disease // *Journal of Neurology*. 2011. № 6 (258). С. 1013–1020.
215. Ruan L. [и др.]. Amyloid deposition and inflammation in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease // *Current Alzheimer Research*. 2009. № 6 (6). С. 531–540.
216. Rudy J.W., O'Reilly R.C. Conjunctive representations, the hippocampus, and contextual fear conditioning // *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*. 2001. № 1 (1). С. 66–82.
217. S. Roriz-Filho J. [и др.]. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009. № 5 (1792). С. 432–443.

218. Sah P. Fear, Anxiety, and the Amygdala // *Neuron*. 2017. № 1 (96). С. 1–2.
219. Salim S., Chugh G., Asghar M. Inflammation in anxiety // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2012. (88). С. 1–25.
220. Salomone S. [и др.]. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs: Disease-modifying drugs for Alzheimer's disease // *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2012. № 4 (73). С. 504–517.
221. Saltiel A.R., Kahn C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism // *Nature*. 2001. № 6865 (414). С. 799–806.
222. Sartorius T. [и др.]. The Brain Response to Peripheral Insulin Declines with Age: A Contribution of the Blood-Brain Barrier? // *PLOS ONE*. 2015. № 5 (10). С. e0126804.
223. Saveanu L., Endert P. van The Role of Insulin-Regulated Aminopeptidase in MHC Class I Antigen Presentation // *Frontiers in Immunology*. 2012. (3).
224. Schulingkamp R.. [и др.]. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2000. № 8 (24). С. 855–872.
225. Schwartz M.W. Diabetes, Obesity, and the Brain // *Science*. 2005. № 5708 (307). С. 375–379.
226. Selkoe D.J., Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years // *EMBO Molecular Medicine*. 2016. № 6 (8). С. 595–608.
227. Shah K., DeSilva S., Abbruscato T. The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. № 12 (13). С. 12629–12655.
228. Shao B.-Z. [и др.]. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review // *Frontiers in Pharmacology*. 2015. (6).

229. Shen Y. [и др.]. Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons // *The Journal of Cell Biology*. 2016. № 5 (215). С. 719–734.
230. Shiiki T. Brain Insulin Impairs Amyloid- (1-40) Clearance from the Brain // *Journal of Neuroscience*. 2004. № 43 (24). С. 9632–9637.
231. Shoji H. [и др.]. Contextual and Cued Fear Conditioning Test Using a Video Analyzing System in Mice // *Journal of Visualized Experiments*. 2014. № 85.
232. Sims-Robinson C. [и др.]. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? // *Nature Reviews Neurology*. 2010. № 10 (6). С. 551–559.
233. Sperling R.A. [и др.]. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia*. 2011. № 3 (7). С. 280–292.
234. Stanley M. [и др.]. The Effects of Peripheral and Central High Insulin on Brain Insulin Signaling and Amyloid- β in Young and Old APP/PS1 Mice // *The Journal of Neuroscience*. 2016. № 46 (36). С. 11704–11715.
235. Stanley M., Macauley S.L., Holtzman D.M. Changes in insulin and insulin signaling in Alzheimer's disease: cause or consequence? // *The Journal of Experimental Medicine*. 2016. № 8 (213). С. 1375–1385.
236. Starkstein S.E. [и др.]. The Construct of Generalized Anxiety Disorder in Alzheimer Disease // *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2007. № 1 (15). С. 42–49.
237. Stienstra R. [и др.]. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity // *Cell Metabolism*. 2010. № 6 (12). С. 593–605.
238. Stienstra R. [и др.]. The Inflammasome Puts Obesity in the Danger Zone // *Cell Metabolism*. 2012. № 1 (15). С. 10–18.

239. Stöhr O. [и др.]. Insulin receptor signaling mediates APP processing and β -amyloid accumulation without altering survival in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // AGE. 2013. № 1 (35). С. 83–101.

240. Stragier B. [и др.]. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin–angiotensin fragment angiotensin IV: a review // Heart Failure Reviews. 2008. № 3 (13). С. 321–337.

241. Straub J.E., Thirumalai D. Toward a Molecular Theory of Early and Late Events in Monomer to Amyloid Fibril Formation // Annual Review of Physical Chemistry. 2011. № 1 (62). С. 437–463.

242. Su W.-J. [и др.]. NLRP3 gene knockout blocks NF- κ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model // Behavioural Brain Research. 2017. (322). С. 1–8.

243. Sui D. [и др.]. Resveratrol Protects against Sepsis-Associated Encephalopathy and Inhibits the NLRP3/IL-1 β Axis in Microglia // Mediators of Inflammation. 2016. (2016). С. 1–10.

244. Swardfager W. [и др.]. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease // Biological Psychiatry. 2010. № 10 (68). С. 930–941.

245. Sweeney M.D., Sagare A.P., Zlokovic B.V. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders // Nature Reviews Neurology. 2018. № 3 (14). С. 133–150.

246. Talbot K. [и др.]. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline // Journal of Clinical Investigation. 2012. № 4 (122). С. 1316–1338.

247. Talbot K. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs // Neurodegenerative Disease Management. 2014. № 1 (4). С. 31–40.

248. Talbot K., Wang H.-Y. The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease // Alzheimer's & Dementia. 2014. № 1 (10). С. S12–S25.

249. Tan M.-S. [и др.]. The NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease // *Molecular Neurobiology*. 2013. № 3 (48). С. 875–882.
250. Tarasoff-Conway J.M. [и др.]. Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease // *Nature Reviews Neurology*. 2015. № 8 (11). С. 457–470.
251. Terrill-Usery S.E., Mohan M.J., Nichols M.R. Amyloid- β (1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1 β despite significant intracellular IL-1 β accumulation in microglia // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014. № 11 (1842). С. 2276–2285.
252. Teune L.K. [и др.]. Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases // *Movement Disorders*. 2010. № 14 (25). С. 2395–2404.
253. Tilvis R.S. [и др.]. Predictors of Cognitive Decline and Mortality of Aged People Over a 10-Year Period // *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2004. № 3 (59). С. M268–M274.
254. Vandanmagsar B. [и др.]. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance // *Nature Medicine*. 2011. № 2 (17). С. 179–188.
255. VanItallie T.B. Alzheimer's disease: Innate immunity gone awry? // *Metabolism*. 2017. (69). С. S41–S49.
256. Verdile G. [и др.]. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease // *Mediators of Inflammation*. 2015. (2015). С. 1–17.
257. Vijayan M., Reddy P.H. Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer's Disease: Molecular Links // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016. № 2 (54). С. 427–443.
258. Viola K.L., Klein W.L. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis // *Acta Neuropathologica*. 2015. № 2 (129). С. 183–206.

259. Wadman M. PRINT - ALZHEIMER'S // Nature. 2012. № 7399 (485). C. 426–427.
260. Walsh D.M., Selkoe D.J. Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease // Neuron. 2004. № 1 (44). C. 181–193.
261. Wang J. [и др.]. Astrocytic l -Lactate Signaling Facilitates Amygdala-Anterior Cingulate Cortex Synchrony and Decision Making in Rats // Cell Reports. 2017. № 9 (21). C. 2407–2418.
262. Waters S.B. [и др.]. The Amino Terminus of Insulin-responsive Aminopeptidase Causes Glut4 Translocation in 3T3-L1 Adipocytes // Journal of Biological Chemistry. 1997. № 37 (272). C. 23323–23327.
263. Wen H. [и др.]. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling // Nature Immunology. 2011. № 5 (12). C. 408–415.
264. Willette A.A. [и др.]. Insulin resistance predicts brain amyloid deposition in late middle-aged adults // Alzheimer's & Dementia. 2015. № 5 (11). C. 504-510.e1.
265. Wiltgen B.J., Silva A.J. Memory for context becomes less specific with time // Learning & Memory. 2007. № 4 (14). C. 313–317.
266. Wirth M. [и др.]. Associations Between Alzheimer Disease Biomarkers, Neurodegeneration, and Cognition in Cognitively Normal Older People // JAMA Neurology. 2013.
267. Woods S. [и др.]. Insulin and the Blood-Brain Barrier // Current Pharmaceutical Design. 2003. № 10 (9). C. 795–800.
268. Xu Y. [и др.]. NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice // Brain, Behavior, and Immunity. 2016. (56). C. 175–186.
269. Yamamoto N. [и др.]. Epigallocatechin gallate induces extracellular degradation of amyloid β -protein by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of ERK and PI3K pathways // Neuroscience. 2017. (362). C. 70–78.

270. Yang E.-J. [и др.]. Alterations in protein phosphorylation in the amygdala of the 5XFamilial Alzheimer's disease animal model // *Journal of Pharmacological Sciences*. 2017. № 4 (133). С. 261–267.

271. Yang T. [и др.]. Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate // *The Journal of Neuroscience*. 2017. № 1 (37). С. 152–163.

272. Yeatman H., Albiston A., Chai S. Insulin-regulated aminopeptidase in astrocytes: Role in Alzheimer's disease? // *Alzheimer's & Dementia*. 2011. № 4 (7). С. S668.

273. Yeh T.-Y.J. [и др.]. Insulin-stimulated exocytosis of GLUT4 is enhanced by IRAP and its partner tankyrase // *Biochemical Journal*. 2007. № 2 (402). С. 279–290.

274. Yin T. [и др.]. Interleukin-9 Induces Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 via JAK Tyrosine Kinases // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. № 35 (270). С. 20497–20502.

275. Youm Y.-H. [и др.]. Canonical Nlrp3 Inflammasome Links Systemic Low-Grade Inflammation to Functional Decline in Aging // *Cell Metabolism*. 2013. № 4 (18). С. 519–532.

276. Zhang H. [и др.]. Characteristics of Insulin-degrading Enzyme in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis // *Current Alzheimer Research*. 2018. № 7 (15). С. 610–617.

277. Zhang Y. [и др.]. P2X7 receptor blockade protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by decreasing the activities of inflammasome components, oxidative stress and caspase-3 // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014. № 1 (281). С. 1–10.

278. Zhang Y. [и др.]. NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-Induced Depression in Mice via Neuroinflammation // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2015. № 8 (18). С. pyv006–pyv006.

279. Zhang Y. [и др.]. Inhibition of Lactate Transport Erases Drug Memory and Prevents Drug Relapse // *Biological Psychiatry*. 2016. № 11 (79). С. 928–939.

280. Zhao W. [и др.]. Brain Insulin Receptors and Spatial Memory: CORRELATED CHANGES IN GENE EXPRESSION, TYROSINE PHOSPHORYLATION, AND SIGNALING MOLECULES IN THE HIPPOCAMPUS OF WATER MAZE TRAINED RATS // Journal of Biological Chemistry. 1999. № 49 (274). С. 34893–34902.

281. Zinchuk V., Zinchuk O., Okada T. Quantitative Colocalization Analysis of Multicolor Confocal Immunofluorescence Microscopy Images: Pushing Pixels to Explore Biological Phenomena // ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA. 2007. № 4 (40). С. 101–111.

282. Zou J., Crews F.T. Inflammasome-IL-1 β Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis // Frontiers in Neuroscience. 2012. (6).