

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

На правах рукописи

КОМЛЕВА

Юлия Константиновна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ
НЕЙРОГЕННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ
ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ, АССОЦИИРОВАННОМ
С НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЕЙ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Салмина Алла Борисовна

Томск – 2019

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	25
1.1. Локальное микроокружение в головном мозге для процессов нейрогенеза	25
1.1.1. Нейрональные стволовые клетки в головном мозге: общая характеристика	27
1.1.2. Нейрогенные ниши во взрослом мозге	32
1.1.3. Клеточные компоненты нейрогенной ниши и их роль в нейрогенезе	38
1.1.4. Идентификация процессов нейрогенеза	43
1.1.5. Роль внешних молекулярных сигналов на формирование микроокружения в нейрогенной нише	44
1.1.6. Регуляция процессов нейрогенеза. Влияние обучение на нейрогенез.....	46
1.1.7. Роль нейрогенеза во время обучения	52
1.2. Болезнь Альцгеймера и влияние нейродегенерации на нейрогенез ...	55
1.2.1. Болезнь Альцгеймера: определение, распространённость, общая характеристика	55
1.2.2. Изменения в нейрогенезе при болезни Альцгеймера.....	57
1.2.3. Роль A β амилоида в нарушенном нейрогенезе	61
1.2.4. Олигомеры бета-амилоида – основная токсическая сопровождающая амилоидных заболеваний.....	64
1.3. Нейровоспаление и нейродегенерация.....	68
1.3.1. Роль глиальных клеток нейрогенных ниш в опосредовании нейровоспаления при нейродегенерации	69
1.3.2. NLRP3: структура, активация и регулирование.....	74
1.3.3. Формирование NLRP3 инфламмасом при нейродегенерации	77
1.3.4. CD38 и CD157: глиальный контроль нейровоспаления при нейродегенерации	80
1.3.5. Рецепторы конечных продуктов гликирования белков RAGE и их роль в развитии нейродегенерации.....	83
1.4. Газовые трансммиттеры как регуляторы формирования локального микроокружения.....	86
1.4.1. Аберрантный ангиогенез и нейрогенез при БА. Роль H ₂ S в нейрогенезе и ангиогенезе	87

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	94
2.1. Объекты исследования	94
2.2. Дизайн эксперимента и группы животных	95
2.3. Моделирование болезни Альцгеймера	104
2.4. Нейроповеденческое тестирование животных	105
2.4. Иммуногистохимическое исследование и конфокальная микроскопия	120
2.5. Окрашивание бета-амилоида	124
2.6. Оценка апоптоза методом TUNEL	124
2.7. Иммуноферментный анализ.....	125
2.8. Электрофизиологическое исследование.....	126
2.9. Выделение и культивирование нейрофер.....	127
2.10. Оптогенетическая стимуляция	128
2.10.1. Амплификация аденовирусов и трансфекция.....	128
2.10.2. Фотоактивация астроцитов, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate	129
2.11. Регистрация пролиферативной активности нейрофер.....	129
2.12. Статистический анализ.....	130
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	132
3.1. Результаты исследований влияния пространственной тренировки и введения растворимых олигомеров на процессы обучения, запоминания, нейрогенеза, нейровоспаления	132
3.2. Результаты исследований ранних изменений в гиппокампальном нейрогенезе при моделировании болезни Альцгеймера и их влияния на процессы кратковременной и отсроченной памяти и нейровоспаления ...	158
3.3. Результаты исследования особенностей экспрессии NLRP3 инфламмасом в GFAP+ астроцитах и NeuN+ гранулярных нейронах мышей с трансгенной моделью болезни Альцгеймера (5xFAD)	174
3.4. Изучение эффекта введения олигомеров бета-амилоида на экспрессию генов раннего реагирования после тестирования когнитивных функций. Экспрессия маркеров ангиогенеза и RAGE	177
3.5. Изучение роли NLRP3 инфламмасом в процессах нейрогенеза и ангиогенеза, синаптической передачи и формирования астроцитов. Исследование поведенческого фенотипа мышей, не экспрессирующих NLRP3 инфламмасы	183

3.5.1. Результаты исследований экспрессии маркеров раннего нейрогенеза в гиппокампе мышей, нокаутных по гену <i>Nlrp3</i>	183
3.5.2. Результаты исследований экспрессии маркеров нейрональной и глиальной природы в гиппокампе мышей, нокаутных по гену <i>Nlrp3</i>	186
3.5.3. Результаты исследований экспрессии маркера ангиогенеза (VEGF) в гиппокампе мышей, нокаутных по гену <i>Nlrp3</i>	190
3.5.4. Результаты записи локальных возбуждающих полевых постсинаптических потенциалов (локальных пВПСП)	192
3.6. Исследование роли NLRP3 в трансинаптической передаче в норме и при моделировании болезни Альцгеймера. Влияние NLRP3 инфламмасом на метаболизм глюкозы.....	195
3.6.1. Результаты определения лактата и IL-1 β и методом иммуноферментного анализа у мышей, нокаутных по гену <i>Nlrp3</i> с инъекцией растворимых форм бета-олигомеров.....	195
3.6.2. Результаты исследования трансинаптической передачи у <i>Nlrp3</i> ^{-/-} мышей с введением растворимых форм бета-олигомеров	198
3.7. Изучение роли эндогенного газового трансммиттера H ₂ S, продуцируемого эндотелиоцитами, в процессах раннего нейрогенеза, формировании клеток астроглиальной природы и экспрессии NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина	202
3.7.1. Результаты исследования маркеров раннего нейрогенеза и клеток астроглиальной природы у мышей, нокаутных по гену <i>CSE</i>	202
3.7.2. Результаты исследования NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина IL1 β у мышей, нокаутных по гену <i>CSE</i> .	204
3.8. Исследование роли рецепторов конечных продуктов гликирования белков (RAGE) в процессах нейрогенеза	206
3.9. Результаты создания статической модели нейрогенной ниши	211
3.10. Результаты нейроповеденческого тестирования	213
3.10.1. Поведенческая оценка пространственной памяти у крыс с инъекционной моделью болезни Альцгеймера	213
3.10.2. Поведенческая оценка тревожности у крыс с инъекционной моделью болезни Альцгеймера	219
3.10.3. Поведенческая оценка эмоциональной ранней и отсроченной памяти у мышей с инъекцией растворимых форм A β олигомеров	222
3.10.4. Поведенческая оценка тревожности и эмоциональной ранней и отсроченной памяти у мышей с семейной формой болезни Альцгеймера	

3.10.4.1. Поведенческая оценка общей и исследовательской активности и тревожности у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (5xFAD) 230	
3.10.4.2. Поведенческая оценка эмоциональной ранней и отсроченной памяти у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (5xFAD).....	236
3.10.5. Поведенческая оценка рабочей памяти у мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера с введением растворимых форм олигомеров бета-амилоида 1-42	242
3.10.6. Поведенческое фенотипирование мышей нокаутных по гену <i>Nlrp3</i> (<i>Nlrp3^{-/-}</i>)	244
3.10.6.1. Поведенческая оценка тревожности у мышей нокаутных по гену <i>Nlrp3</i> (<i>Nlrp3^{-/-}</i>)	244
3.10.6.2. Поведенческая оценка социального поведения у мышей нокаутных по гену <i>Nlrp3</i> (<i>Nlrp3^{-/-}</i>)	254
3.10.6.3. Поведенческая оценка ранней эмоциональной памяти у мышей нокаутных по гену <i>Nlrp3</i> (<i>Nlrp3^{-/-}</i>)	256
3.10.7. Поведенческая оценка эмоциональной памяти у мышей нокаутных по гену <i>Nlrp3</i> (<i>Nlrp3^{-/-}</i>) с введением растворимых форм A β 1-42.....	260
3.10.8. Влияние делеции гена <i>CSE</i> на когнитивные функции и тревожность	264
3.10.8.1. Поведенческая оценка общей и исследовательской активности и тревожности у мышей нокаутных по гену <i>CSE</i> (<i>CSE^{-/-}</i>).....	264
3.10.8.2. Поведенческая оценка социализации и социальной памяти у мышей нокаутных по гену <i>CSE</i> (<i>CSE^{-/-}</i>)	269
3.10.8.3. Поведенческая оценка рабочей памяти у мышей нокаутных по гену <i>CSE</i> (<i>CSE^{-/-}</i>)	270
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	273
4.1. Особенности нейрогенеза и субпопуляций астроцитов в нейрогенной нише головного мозга в норме и при нейродегенерации: роль когнитивной стимуляции. Экспрессия NLRP3 инфламмасом на разных этапах нейрогенеза	275
4.2. Гиппокампальный нейрогенез после инъекции олигомеров бета-амилоида. Экспрессия NLRP3 инфламмасом и медиаторов воспаления в нейрогенных нишах в норме и при нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией.....	293

4.3. Экспрессия NLRP3 инфламмасом на клетках нейрональной и глиальной природы в пределах нейрогенной ниши в семейной модели болезни Альцгеймера. Эмоциональная ранняя и отсроченная память у мышей с семейной формой болезни Альцгеймера.....	307
4.4. Эффект введения олигомеров бета-амилоида на экспрессию генов раннего реагирования после тестирования когнитивных функций. Экспрессия маркеров ангиогенеза и RAGE	311
4.5. Роль NLRP3 инфламмасом в процессах нейрогенеза и ангиогенеза, синаптической передачи и формирования астроцитов. Исследование поведенческого фенотипа мышей, не экспрессирующих NLRP3 инфламмасы	316
4.6. Роль NLRP3 в транссинаптической передаче и формировании памяти в норме и при моделировании болезни Альцгеймера. Влияние NLRP3 инфламмасом на метаболизм глюкозы.....	326
4.7. Роль эндогенного газового трансммиттера H ₂ S, продуцируемого эндотелиоцитами, в процессах раннего нейрогенеза, формирования клеток астроглиальной природы и экспрессии NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина. Влияние делеции гена <i>CSE</i> на когнитивные функции и тревожность.....	333
4.8. Роль рецепторов конечных продуктов гликирования белков (RAGE) в процессах нейрогенеза.....	338
4.9. Пролиферация нейрональных предшественников при модуляции активности клеток астроглии в микроокружении нейрогенной ниши в норме и при действии олигомеров бета-амилоида <i>in vitro</i>	340
ВЫВОДЫ.....	350
Практические рекомендации	353
Список сокращений	354
Список использованной литературы.....	355

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой деменции, при этом число пациентов постоянно увеличивается в зависимости от демографической ситуации. По прогнозам в 2020 году число пациентов с деменцией во всем мире составит 42,3 млн, при этом около 4,6 млн. новых случаев будет регистрироваться ежегодно. Распространенность БА резко увеличивается с возрастом. Так примерно 1% пациентов страдает данной патологией в возрастной группе от 60 до 65 лет и эта цифра неуклонно растет и достигает около 30% в группе людей в возрасте 90 лет и старше [16].

Хроническая нейродегенерация при болезни Альцгеймера является результатом совокупного действия большого числа aberrantных механизмов функционирования клеток головного мозга, в том числе нарушений нейрогенеза, синаптической пластичности и синаптогенеза, нейрон-глиальных взаимодействий, церебрального кровотока, а также нейровоспаления и прогрессирующей гибели клеток нейрональной и глиальной природы [15].

Болезнь Альцгеймера представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, в патогенезе которого первоочередную роль играют растворимые олигомеры бета-амилоида [26]. Растворимые олигомеры являются токсичными для нейронов *in vitro* и *in vivo* [358]. Изменения в головном мозге, индуцированные токсичным действием бета-амилоида, затрагивают в первую очередь гиппокамп, приводя к драматическому снижению когнитивных функций.

Зубчатая извилина гиппокампа представляет собой пластичную структуру, в которой происходит нейрогенез у взрослых особей. Клеточные

компоненты нейрогенной ниши являются источником разнообразных паракринных, мембраносвязанных факторов, например, цитокинов, факторов роста, трансммиттеров, которые регулируют нейрогенез гиппокампа у взрослых и определяют приобретение клеточной судьбы. Интеграция и скоординированные действия нескольких внешних и внутренних сигналов определяют процесс постоянного решения: остаются ли нейрональные стволовые клетки в покое или могут пролиферировать, принимают они нейрональное или глиальное происхождение, а также если новообразованные клетки пролиферируют, подвергаются ли они апоптотической гибели или выживают [312].

Правильный баланс в молекулярной среде нейрогенной ниши приводит к преимущественной генерации нейронов, а не астроцитов. Однако, этот баланс и уровень пролиферации меняется при модификации микроокружения, которое может быть изменено под действием когнитивной стимуляции или нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией.

В этой диссертационной работе рассмотрены клеточные и молекулярные компоненты нейрогенной ниши – субгранулярной зоны, с акцентом на молекулах, активных сигнальных путях и генетических программах, которые поддерживают покой, вызывают пролиферацию или способствуют дифференцировке клеток. Полученные данные направлены на понимание организации нейрогенного микроокружения, участвующего в восстановлении когнитивных функций, а также расширении регенеративного потенциала головного мозга.

«Когнитивный резерв» связан со способностью головного мозга поддерживать когнитивные функции, несмотря на то, что они находятся под постоянным негативным влиянием стрессовых факторов и дегенеративных событий, связанных со старением и развитием болезни Альцгеймера. Известно, что гиппокампальный нейрогенез – это продолжающийся в течение жизни процесс непрерывного встраивания функционально активных новых нейронов в нейрональные цепи. Соответственно, нейрогенез во взрослом

гиппокампе все чаще рассматривается как ключевой фактор устойчивости «когнитивного резерва» [87].

Особо актуальным становится использование технологий управления регенеративным потенциалом головного мозга при лечении таких патологий, сопряженных с развитием когнитивного дефицита как болезнь Альцгеймера [180]. Нейрональные стволовые клетки (НСК) присутствуют в зубчатой извилине гиппокампа и субвентрикулярной зоне, где нейрогенез продолжается в развивающемся и взрослом мозге млекопитающих, в том числе и человека [62, 450]. Нейрогенез включает генерацию, миграцию, выживание, дифференцировку и функциональную интеграцию вновь образованных нейронов в функциональные нейронные цепи. Все эти процессы происходят при регуляции различными факторами, выделяемыми в нейрогенной нише, которая обеспечивает локальное микроокружение и способствует поддержанию процесса взрослого нейрогенеза [372]. Таким образом, факторы, осуществляющие контроль над распространением, самообновлением и дифференциацией НСК приобретают все больший интерес исследователей. Поэтому важным аспектом в понимании процессов нейрогенеза остается исследование молекулярных механизмов *in vivo* и *in vitro*, участвующих в обеспечении локального микроокружения.

Поскольку известно, что нарушение регуляции нейрогенеза гиппокампа у взрослых связано с прогрессированием болезни Альцгеймера, тем не менее до сих пор вклад нейрогенеза гиппокампа в патофизиологию этого заболевания является неопределенным [74, 84]. Кроме того, образование новых нейронов в гиппокампе может потенциально представлять эндогенный ауторепараторный механизм, который может ослаблять потерю нейронов и когнитивные нарушения, связанные с БА [91].

Более того, пролиферация и дифференцировка нейрональных стволовых клеток не является статическим процессом; скорее всего это динамически активное состояние, которое регулируется различными гуморальными и адгезионными факторами в физиологических и патофизиологических

условиях [288]. Таким образом, идентификация различных эндогенных факторов, регулирующих активность НСК, может способствовать дальнейшему пониманию нейронного онтогенеза, а также развитию новых терапевтических стратегий восстановления мозга [312]. Так например, недавно в литературе появились описания стимулирующего влияния выделения цитокинов астроцитами на нейрогенез и синаптогенез [75].

Развитие нейровоспаления может существенным образом влиять на функционирование нейронных ниш, эффективность нейрогенеза, направленной миграции и системной интеграции вновь образованных клеток, однако насколько однозначно такое влияние и как оно регулируется, остается не выясненным. При патологических состояниях, таких как нейровоспаление, большой массив воспалительных цитокинов секретируется во внеклеточное пространство. Биологические действия и профили этих секретируемых воспалительных цитокинов могут варьироваться в зависимости от контекста (например, острое или хроническое воспаление, развивающийся или зрелый мозг и т. д.), а само нейровоспаление в целом может влиять на нейрогенез как положительно, так и отрицательно [111].

Вероятнее всего, развитие нейровоспаления приводит к повреждению клеток, снижению регенеративного потенциала клеток-предшественников [172], однако в литературе накапливается все больше данных о позитивном эффекте локальных медиаторов и клеток-эффекторов воспаления в отношении процессов нейрогенеза и ассоциированных с ним событий: активированные клетки микроглии стимулируют нейрогенез и способствуют синаптогенезу [124], нарушение присутствия микроглии и секреции провоспалительных цитокинов в нейронных нишах снижает жизнеспособность и пролиферативную активность прогениторных клеток [103].

Общей чертой нейродегенеративных расстройств, в частности болезни Альцгеймера, является хроническое нейровоспаление и/или активация микроглии и астроглии, которые, вероятно, влияют на нейрогенез взрослых и способствуют развитию болезни. Первоначально рассматриваемый как

эпифеномен в нейродегенеративном процессе, нейровоспаление все чаще реализуется как неотъемлемый компонент многих нейродегенеративных заболеваний. Существует много потенциальных факторов, способствующих хроническому нейровоспалительному состоянию при БА, а доминирующая гипотеза заключается в том, что образуется порочный круг между глиальной активацией и гибелью нейронов, то есть связанные с опасностью молекулярные структуры DAMPs, выпущенные из вырожденных нейронов, активируют глиальные клетки через toll-подобные рецепторы (TLR), и нейровоспаление оказывает дальнейшее содействие прогрессированию нейродегенерации [111]. Активация данных рецепторов приводит к сборке так называемого цитозольного мультипротеинового комплекса – инфламмосомы NLRP [17, 359]. Ранее исследования свидетельствовали о том, что активация воспаления NLRP3 посредством DAMPs играет центральную роль в воспалении, вызванном ожирением, инсулинорезистентностью, сахарным диабетом 2 типа, а также при нейродегенеративных заболеваниях [240].

Таким образом, все больше данных свидетельствует о том, что нейровоспаление влияет на нейрогенные ниши и взрослый нейрогенез, что способствует патогенезу многочисленных нейродеструктивных, нейропсихиатрических и неврологических расстройств. Однако многие вопросы остаются без внимания. Так, например, в воспаленном мозге разнообразный спектр воспалительных молекул сосуществует и потенциально взаимодействует, а сходящийся эффект от нейрогенеза может отличаться от сходимости отдельных цитокинов. Кроме того, такой эффект может существенно различаться при когнитивной стимуляции головного мозга. Изучение механизмов того, как нейровоспаление регулирует нейрогенез в контексте различных заболеваний, а также моделирование нейрогенеза путем нацеливания на нейровоспаление может обеспечить новую терапевтическую стратегию для этих нарушений мозга.

Хотя воспаление, как правило, не может представлять собой иницирующий фактор в развитии нейродегенеративных заболеваний,

появляется все больше данных с использованием моделей на животных, которые демонстрируют, что воспалительные реакции с участием микроглии и астроцитов способствуют прогрессии заболевания [23, 159, 230]. Так было описано, что секреция ИЛ-1 β имеет важное значение при заболеваниях центральной нервной системы. Однако, точный механизм еще до конца не выяснен, поскольку были описаны не только нейротоксичная, но регенеративная роли [365].

Одним из подходов к решению указанных вопросов является изучение роли клеток астроглиальной природы, участвующих как в регуляции процессов нейрогенеза, так и воспаления. Известно, что значительный пул клеток нейрогенных ниш представлен астроцитами, которые сохраняют свойства стволовых клеток на протяжении всей жизни [38], в то время как метаболическая перестройка астроглии, астродегенерация и формирование aberrantных межклеточных взаимодействий сопровождают прогрессирование хронической нейродегенерации. Астроцитам принадлежит особая роль в регуляции процессов нейрогенеза и нейровоспаления: с одной стороны, нейрогенный потенциал клеток астроглиальной природы обеспечивает реализацию программы нейрогенеза в эмбриональном и взрослом периодах онтогенеза, формирование микроокружения в нейрогенных нишах и миграционных путей для вновь образованных клеток [278], с другой стороны, астроцитам, наряду с клетками микроглии, принадлежит важная роль в развитии т.н. реактивного глиоза, сопровождающего воспаление, в нарушении проницаемости гематоэнцефалического барьера, паракринной регуляции воспаления за счет локальной продукции цитокинов, а также в развитии вторичной альтерации нейронов в очаге воспаления вследствие нарушения нейрон-астроглиального метаболического сопряжения и реализации феномена эксайтотоксичности [259]. Описаны стимулирующее влияние цитокин-активированных астроцитов на нейрогенез и синаптогенез [76], роль ИЛ-1-опосредованной сигнальной трансдукции в астроцитах для реализации механизмов

запоминания [39]. ИЛ-1 увеличивает захват и метаболизм глюкозы активированными астроцитами, что может быть в равной степени необходимо для поддержания эффективного нейрогенеза и реализации когнитивных функций [433]. В то же время, про- и противовоспалительный потенциал астроцитов до сих пор не получил подробной характеристики.

Патофизиологическое изменение метаболизма глюкозы в головном мозге может служить ранним биомаркером для диагностики БА [444]. Метаболизм глюкозы в астроцитах обеспечивает образование лактата, захватываемого нейронами, использующими его в качестве энергетического субстрата, этот же механизм необходим для реализации процессов, сопряженных с активным нейрогенезом или реактивным астроглиозом: известно, что реактивные астроциты изменяют характер утилизации глюкозы, что представляется необходимым для приобретения ими соответствующего фенотипа и экспрессии белков, регулирующих их пролиферативный потенциал [307]. Известно, что гиппокамп имеет решающее значение для кодирования декларативной памяти. Вместе с тем остается неизвестным, как меняется уровень метаболитов глюкозы в гиппокампе при предоставлении социальных и несоциальных стимулов мышам.

При болезни Альцгеймера нарушается структура и функция сосудов мозга и клеток в нейроваскулярной единице [139]. Нейроны и глиальные клетки функционируют во взаимодействии с эндотелиальными клетками для поддержания гомеостаза церебрального микроокружения. Таким образом, нейроваскулярная единица сохраняет жесткий контроль химического микроокружения в мозге путем регулирования локального мозгового кровотока и транспорта сигнальных молекул [320]. Газовый трансмиттер H_2S является эндогенным газообразным медиатором, который вырабатывается, в том числе и в клетках астроглиальной природы, нейронах и эндотелии. Биологические эффекты H_2S , особенно в центральной нервной системе, остаются до конца не выясненными [283]. Церебральные эндотелиоциты могут использовать H_2S , чтобы вызвать релаксацию гладкомышечных клеток

и увеличить локальный кровоток в активных регионах мозга. Поэтому, H_2S , вырабатываемый астроцитами или эндотелиальными клетками в составе нейроваскулярной единицы, может опосредовать глиоваскулярный контроль, регулирующий кровоток в соответствии с фактическими потребностями в активированной области мозга. Эти события могут быть актуальны для формирования локального микроокружения в нейрогенных нишах головного мозга, обеспечивающих у взрослого организма репаративный нейрогенез, а также нейрогенез, сопровождающий реализацию когнитивных функций.

Таким образом, рассмотрение вопросов влияния различных эндогенных факторов на формирование микроокружения, функционирование нейрогенных ниш, а также эффективный нейрогенез является весьма актуальной задачей. Роль нейровоспаления в опосредовании процессов нейрогенеза при хронической нейродегенерации требует учета широкого спектра факторов, регулирующих функциональную активность клеток нейрональной и глиальной природы.

Анализ литературных данных и результатов предыдущих исследований относительно роли внешних факторов на нейрогенез позволил сформулировать рабочую гипотезу о том, что изменение функциональной активности клеток-компонентов нейрогенной ниши в очаге воспаления при хронической нейродегенерации, связанное с формированием в этих клетках инфламмосом, продукцией провоспалительных цитокинов, газовых транмиттеров определяет характер нейрогенеза, а последствия такого влияния обусловлены тем, каким образом клетки в нейрогенных нишах вовлечены в процесс нейровоспаления.

Фундаментальная научная проблема, решаемая в рамках настоящего диссертационного исследования, связана с расшифровкой молекулярных механизмов влияния клеток-эффекторов, гуморальных медиаторов воспаления, газового транмиттера на формирование локального микроокружения и нейрогенез, что не только расширит наши представления о механизмах структурной и функциональной пластичности мозга, но и

позволит идентифицировать новые молекулы-мишени для фармакологической коррекции хронической нейродегенерации.

Цель исследования

Изучить молекулярно-клеточные механизмы формирования нейрогенного локального микроокружения в головном мозге, контролирующие эффективность нейрогенеза и ангиогенеза в норме и при развитии воспаления, ассоциированного с нейродегенерацией при экспериментальной болезни Альцгеймера; оценить влияние выполнения когнитивных задач на процессы нейрогенеза в нейрогенной нише головного мозга экспериментальных животных.

Задачи исследования

1. Выявить особенности формирования кратковременной и отсроченной памяти, оценить их ассоциированность с процессами нейрогенеза, распределения субпопуляции астроцитов в нейрогенной нише головного мозга у грызунов в норме и при развитии нейровоспаления при моделировании болезни Альцгеймера в эксперименте, а также определить роль стимуляции когнитивных функций в данных процессах.

2. Охарактеризовать жизнеспособность, миграционную активность нейрональных предшественников, эффективность процессов нейрогенеза и когнитивные функции в зависимости от характера экспрессии инфламмасом NLRP3, медиаторов воспаления ($IL1\beta$, HMGB1) в астроцитах, формирующих нейрогенные ниши и миграционные потоки, при нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией.

3. Изучить влияние молекулярных механизмов паракринной регуляции нейрогенеза, сопряженных с активностью CD38, CD157, экспрессией RAGE и эндогенного газового трансммиттера H_2S в нейрогенном микроокружении на процессы раннего нейрогенеза в норме и при нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией.

4. Исследовать роль NLRP3 инфламмасом в реализации сложных форм поведения, процессах нейрогенеза и ангиогенеза, синаптической передачи, метаболизме глюкозы и формировании астроцитов; оценить влияние растворимых форм олигомеров бета-амилоида на NLRP3-ассоциированные процессы.

5. Оценить роль олигомеров бета-амилоида в регуляции метаболизма клеток эндотелия церебральных микрососудов, процессов церебрального ангиогенеза и поддержания структурно-функциональной целостности ГЭБ в норме и при нейродегенерации.

6. Оценить пролиферацию нейрональных предшественников при модуляции активности клеток астроглии в микроокружении нейрогенной ниши в норме и при действии олигомеров бета-амилоида *in vitro*.

7. На основе полученных экспериментальных данных установить общие закономерности формирования нейрогенного микроокружения и особенности их клеточно-молекулярных механизмов в зависимости от экспрессии NLRP3 инфламмасом в норме и при нейровоспалении, ассоциированном с развитием нейродегенерации.

Научная новизна

Впервые установлено, что обучение способствует увеличению экспрессии инфламмасом в стволовых клетках и нейробластах в нейрогенных нишах в здоровом мозге, тем самым способствуя процессу консолидации памяти. Нейродегенерация альцгеймеровского типа приводит к нарушению этого механизма.

Получены новые данные о том, что когнитивная нагрузка не влияет на выживаемость клеток и не приводит к увеличению экспрессии гена структурной пластичности Arc/Arg3.1, напротив приводит к снижению числа астроцитов.

Впервые показано, что нокаутирование гена *Nlrp3* при инъекции растворимых форм бета-амилоида не приводит к развитию нейровоспаления,

оказывая тем самым нейропротекторный эффект. У таких мышей не происходит изменений метаболизма глюкозы, а также синаптической передачи импульса. Это позволяет сделать заключение о индифферентности нокаутирования *Nlrp3* гена по отношению к моделированию нейродегенерации.

Настоящее исследование впервые продемонстрировало, что базовый уровень NLRP3-опосредованного нейровоспаления в головном мозге мышей необходим для обусловленной кондиционированием пластичности в вентральном гиппокампе, в то время как делеция *Nlrp3* нарушает синаптическую трансдукцию и вызывает тревожное поведение и затруднение в запоминании. Это дает право предложить новую гипотезу о роли асептического воспаления, определяемого активностью NLRP3-инфламмасом и продукцией ИЛ-1, в реализации когнитивных функций и запоминания в физиологических условиях.

Впервые описано, что делеция гена *RAGE* приводит к изменениям в нейрогенезе и характеризуется снижением экспрессии маркеров как ранних этапов нейрогенеза, так и этапов приобретения клетками нейрональной судьбы.

Получены новые данные относительно того, что делеция гена *CSE* приводит к увеличению экспрессии маркеров воспаления, а значит нормальный физиологический уровень экспрессии H_2S в эндотелиоцитах головного мозга обладает противовоспалительными свойствами.

В рамках выполнения работы создан и апробирован в эксперименте новый подход к управлению процессом нейрогенеза *in vitro*, базирующийся на оптогенетической регуляции активности клеток астроглиальной природы в составе нейрогенной ниши, получено экспериментальное доказательство того, что фотоактивированные астроциты в составе нейрогенной ниши *in vitro* способствуют увеличению пролиферативной активности клеток. В модели нейродегенерации *in vitro* с применением нейротоксического $A\beta_{1-42}$ впервые продемонстрировано снижение эффективности нейрогенеза *in vitro*, и

обнаружено, что целевая активация астроцитов в составе гиппокампальной нейрогенной ниши обеспечивает частичное восстановление процессов пролиферации.

Личный вклад соискателя

Научные результаты, описанные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно. Диссертантом определены цели, задачи, разработан план и дизайн исследования, реализованы протоколы экспериментальной части диссертации. Автор выполнил набор материала, нейропсихическое исследование животных, моделирование патологии (совместно с к.м.н. Черных А.И.), иммуногистохимические эксперименты, иммуноферментный анализ (в том числе совместно с к.фарм.н., доцентом Я. В. Гориной и д.б.н. О.Л. Лопатиной). Электрофизиологические исследования и оптогенетическая стимуляция выполнены совместно с к.м.н. А.Н. Шуваевым, аспирантом И.В. Потапенко, моделирование нейрогенной ниши *in vitro* совместно с к.м.н. Моргун А.В., н.с. Осиповой Е.Д. Автор лично провел статистическую обработку материала исследований и интерпретацию результатов; написание публикаций, автореферата и текста диссертации.

На основе полученных диссертантом данных подготовлены к публикации материалы по теме диссертации (тезисы, статьи, монография) – полностью и в соавторстве. Оформление диссертации и автореферата выполнены автором лично.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе диссертационного исследования определены молекулярно-клеточные механизмы формирования локального микроокружения при нейровоспалении, что является основой для разработки новых технологий управления молекулярными механизмами межклеточной коммуникации для задач трансляционной медицины.

Получены данные об изменениях нейрогенеза, роли локальной микросреды и молекул, выделяемых клетками-компонентами нейрогенной ниши на ранних стадиях болезни Альцгеймера, что позволяет использовать их для разработки методов ранней диагностики. Идентификация новой роли молекул NLRP3, CSE и RAGE в нормальном развитии головного мозга и формировании микроокружения в норме и при патологии.

Доказана роль пространственной тренировки в увеличении «когнитивного резерва» и пула нейрональных стволовых клеток в нейрогенных нишах.

Полученные новые данные о механизмах регуляции нейрогенеза при воспалении, ассоциированном с развитием хронической нейродегенерации, обосновывают новые подходы к коррекции регенеративного потенциала головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Получены новые экспериментально подтвержденные данные, перспектива использования которых связана с разработкой новых технологий управления нейрогенезом в головном мозге за счет оптогенетического контроля функциональной активности стволовых и прогениторных клеток и воспроизведением микроокружения, способствующего их развитию, для коррекции когнитивного дефицита при экспериментальной нейродегенерации.

Существенно дополнена концепция патогенеза нейродегенерации, связанной с развитием воспаления, с актуализацией механизмов нарушения нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга и дисрегуляции процесса формирования локального микроокружения, определяющего эффективность нейрогенеза, что определяет развитие нового направления в разработке способов восстановления нейрогенного потенциала клеток головного мозга при хронической нейродегенерации.

Методология и методы исследования

Работа носит экспериментальный характер. Для решения поставленных

задач в работе использовались различные линии животных, а также проводилось моделирование патологии. Объект исследования – крысы-самцы линии Wistar, мыши-самцы линии CD1 и C57BL/6, B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/JJ с нокаутированием гена *Nlrp3*; *CSE*-нокаутные мыши на генетическом фоне C57BL/6, *RAGE*-нокаутные мыши на генетическом фоне C57BL/6. Предмет исследования – оценка маркеров нейрогенеза, нейровоспаления в экспериментальных группах, модель нейрогенной ниши. В рамках эксперимента проведено нейропсихическое тестирование животных с применением методов изучения общей и поисковой активности («Открытое поле»), тревожности («Приподнятый крестообразный лабиринт», «Темно-светлая камера»), когнитивных функций («Условно-рефлекторное замирание», «Водный лабиринт Морриса», «Распознавание нового объекта»), социального поведения («Трехкамерная активность», «Социальный пятипопыточный тест»). С помощью иммуногистохимического исследования срезов головного мозга, иммуноферментного анализа были исследованы основные маркеры нейрогенеза, фенотипированы клетки различной природы, изучены молекулы микроокружения в нейрогенной нише. Методы в эксперименте также включали в себя электрофизиологическое исследование, оптогенетическую стимуляцию, моделирование нейрогенной ниши *in vitro*. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

Исследования выполнялись на базе ФГБОУ ВО "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Минздрава России, Немецкого института исследования питания человека (German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke (DIfE)), Потсдам, Германия; Экспериментального и клинического центра Университета Шарите, Берлин, Германия (научные консультанты: профессор Майк Голлаш, профессор Штефания Кремер).

Положения, выносимые на защиту

1. НАД⁺-конвертирующие ферменты, сероводород-продуцирующие ферменты, рецепторы RAGE, экспрессируемые в нейрогенном микроокружении головного мозга экспериментальных животных, участвуют в регуляции локального микроокружения в нейрогенных нишах, контролирующего процессы пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза клеток нейрональной и глиальной природы.

2. Действие растворимых олигомеров бета-амилоида приводит к нарушению нейрогенеза за счет изменения пролиферации нейрональных предшественников, что ассоциировано с разнонаправленной экспрессией CD38 и CD157, увеличением экспрессии медиаторов воспаления, рецепторов конечных продуктов гликирования белков RAGE в клетках зубчатой извилины гиппокампа, aberrантным ангиогенезом и нарушением структурной целостности ГЭБ, а также изменениями сложных форм поведения при экспериментальной болезни Альцгеймера.

3. Базальный уровень экспрессии NLRP3 инфламмасом необходим для процессов запоминания и обучения, нейрогенеза и синаптической передачи сигнала. Когнитивная стимуляция вызывает увеличение «когнитивного резерва» и сопровождается увеличением пула нейрональных стволовых клеток в нейрогенных нишах, приводит к эффективному нейрогенезу и ассоциирована с увеличением экспрессии NLRP3 инфламмасом.

4. Блокирование экспрессии NLRP3 нарушает процессы нейропластичности, а патологически усиленная экспрессия NLRP3 в клетках нейрогенного микроокружения сопровождается развитием нейровоспаления при экспериментальной болезни Альцгеймера.

5. Развитие экспериментальной болезни Альцгеймера сопровождается нарушением астроцит-опосредованного контроля нейрогенеза, оптогенетическая стимуляция GFAP⁺ клеток нейрогенных ниш

частично восстанавливает пролиферативный потенциал клеток нейрогенных ниш.

Степень достоверности результатов

Полученные результаты имеют высокий уровень статистической значимости. Научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием современных методических приемов и высокоинформативных методов исследования (иммуногистохимия, иммуноферментный анализ, электрофизиологическое исследование), высокотехнологичного оборудования, выборкой исследуемых животных в соответствии с основными принципами 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: на национальной конференции "От фундаментальной неврологической науки к клинике", 2014, г. Москва; Международном конгрессе по нейронаукам, 2014, г. Красноярск; на 9th FENS Forum of Neuroscience (9 Форум по нейронаукам Федерации европейских нейронаучных обществ), 2014, г. Милан, Италия; на Российско-германской конференции "Фундаментальные и клинические проблемы артериальной гипертензии и нейродегенеративных заболеваний", 2014, г. Красноярск; на Rus-LASA – ICLAS международной конференции "Science-based assessment of laboratory animal welfare", 2014, г. Санкт-Петербург; на международной конференции 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 2015, Геттинген, Германия; на первой национальной интеллектуальной лидерской конференции INRU "Энергия Сибири", 2015, Красноярск; на 95th Annual Meeting of the German Physiological Society (Ежегодная конференция немецкого физиологического общества 2016, Любек, Германия; на 9th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair (9 Международный симпозиум по нейропротекции и

нейровосстановлению, 2016, Лейпциг, Германия); на международном конгрессе Berlin BRAIN & BRAIN PET 2017, the 28rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the 13th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (28 Международный симпозиум по церебральному кровотоку, метаболизму, 2017, Берлин, Германия; на международной конференции NeuroFrance 2017, г.Бордо, Франция; на международной конференции Frontiers in Metabolism: From systems physiology to precision medicine Новое в области метаболизма: от системной физиологии к индивидуализированной медицине, 2017, г. Лозанна, Швейцария; на международной конференции 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 2017, Геттинген, Германия; на XXIII Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова, 2017, г. Воронеж; на международном симпозиуме Training Program for Russia-Japan leaders of tomorrow, 2018, г.Красноярск; на международном российско-немецком семинаре Advances in neurodegenerative Disorders and Stroke, 2018, г. Красноярск.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 33 печатные работы, в том числе 15 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, 7 статей в журналах международных баз данных (МБД) Web of Science (WOS), Scopus, 1 монография, 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 398 страницах машинописного текста, иллюстрирован 133 рисунками и 6 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, глав: материал и методы, результаты собственных исследований, обсуждения, заключения,

выводов, списка литературы. Список литературы включает 454 источника, в том числе 17 отечественных и 437 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 2014-2015 (НШ-1172.2014.7).

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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Локальное микроокружение в головном мозге для процессов нейрогенеза

Постулат о том, что взрослый мозг не обладает нейрогенным потенциалом, был поставлен под сомнение еще в 1990-х годах. При исследовании мозга у больных раком, прошедших химиотерапию, в нескольких исследованиях обнаружены BrdU + нейробласты во взрослом мозге. Вскоре после этих сообщений присутствие пролиферирующих нейробластов во взрослом мозге было подтверждено у разных видов животных, включая приматов. Кроме того, было продемонстрировано, что нейрогенез взрослого человека происходит не только в физиологических условиях, но и при повреждении головного мозга, а вновь созданные нейроны могут мигрировать в сторону поврежденных участков, что свидетельствует о том, что нейрогенез взрослых функционирует как эндогенный механизм восстановления [31]. Эти новаторские исследования стимулировали интенсивный интерес к исследованию клеточных и молекулярных механизмов, а также функции нейрогенеза во взрослом мозге, и за последние 20 лет был достигнут значительный прогресс в этом направлении [112].

Множество исследований показывает, что молекулярные механизмы, регулирующие эмбриональный и взрослый нейрогенез, весьма схожи [148]. Однако, несмотря на сходства, существует несколько существенных различий. Первым является отличительное поведение между эмбриональными и взрослыми НСК. Эмбриональные НСК быстро размножаются, а их потомство, постмитотические незрелые нейроны, мигрируют на большее расстояние, чтобы заполнить весь мозг. Напротив, взрослые НСК в нейрогенных нишах находятся в покоящемся состоянии и остаются в течение длительного периода

времени вне клеточного цикла, тогда как их потомство мигрирует либо по ограниченным маршрутам, либо на короткие расстояния (например, нейроны субвентрикулярной зоны мигрируют к обонятельной луковице через RMS, в то время как клетки зубчатой извилины мигрируют внутри слоя гранулярных клеток). Во-вторых, эмбриональные НСК имеют большой потенциал дифференцировки, то есть они могут генерировать огромное разнообразие нейрональных и глиальных типов, что контрастирует с довольно ограниченными типами нейронов (или перигломерулярных, или гранулярных клеток), образованных из НСК в процессе взрослого нейрогенеза. Основным фактором, лежащим в основе этих различий, является определенное внеклеточное микроокружение, в котором находятся эмбриональные и НСК во взрослом мозге. Внеклеточная среда эмбрионального мозга, которая быстро меняется, способствует нейрогенезу, а во взрослом мозгу она остается в стабильном гомеостазе и в целом способствует глиогенезу. Наконец, с функциональной точки зрения, нейрогенез в субгранулярной зоне у взрослых уникален и четко отличается от эмбрионального нейрогенеза. В последние годы становится ясно, что взрослые нейроны гиппокампа необходимы для формирования памяти, зависящей от опыта, особенно пространственного и контекстного обучения и памяти [112, 314].

На сегодняшний день хорошо известно, что нейрональные стволовые клетки (НСК) находятся в головном мозге большинства взрослых млекопитающих, включая человека, и что нейрогенез происходит в течение всей жизни [208, 270].

Интересно, что области, в которых происходит активный нейрогенез у взрослых, расположены в отдельных, но специфических областях мозга. Эти области, известные как «нейрогенные ниши», состоят из различных типов клеток, специфических межклеточных контактов и определенных внеклеточных сигналов, возникающих как локально, так и отдаленно. Таким образом, функция различных клеточных и молекулярных компонентов ниши поддерживает физиологию НСК, уравновешивая стадии покоя (молчание

стволовые клетки) с пролиферацией и регулируя дифференцировку клеток [80].

В этом контексте не только цитоархитектоническая организация ниши, но и способы коммуникации между клеточными компонентами имеют решающее значение для понимания нейрогенного процесса у взрослых как при физиологических, так и при патологических состояниях (Рисунок 1).

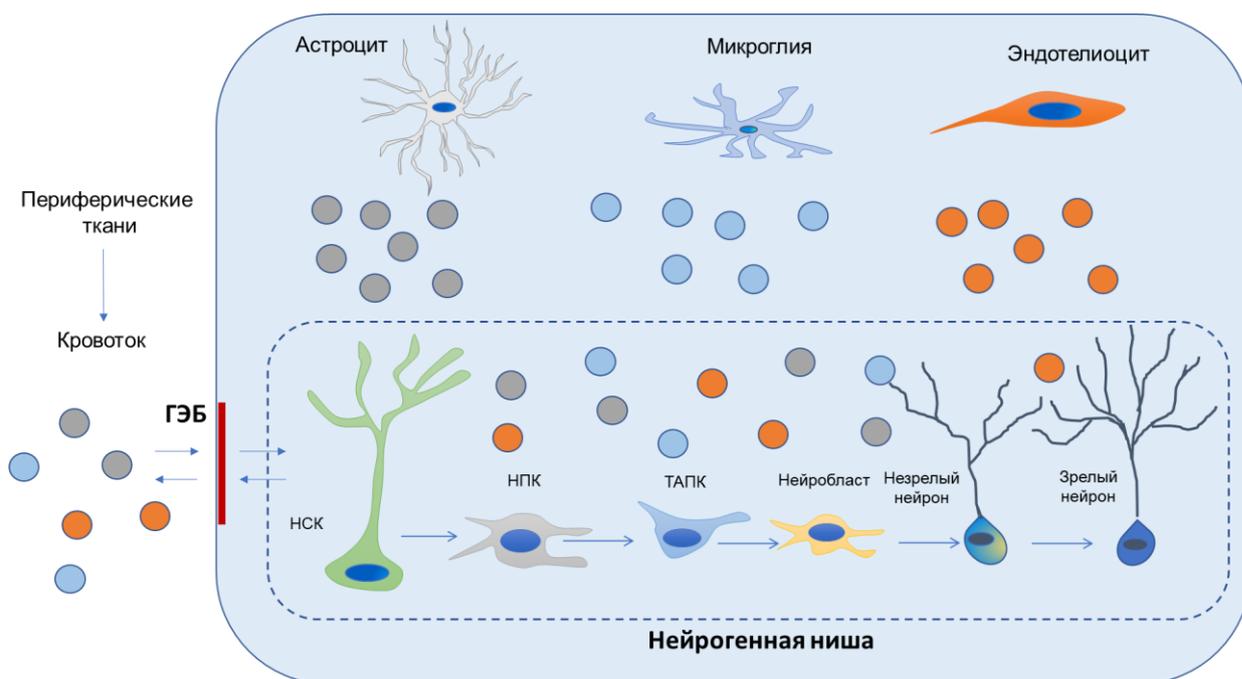


Рисунок 1 – Взаимодействие компонентов нейрогенной ниши. Оригинальная схема, составленная по данным литературы.

Клетки взаимно связываются с другими клетками посредством

- (1) межклеточных контактов
- (2) секретируемых молекул, таких как факторы роста, цитокины, гормоны и т. д. (паракринная, аутокринная или эндокринная регуляция) [80].

1.1.1. Нейрональные стволовые клетки в головном мозге: общая характеристика

Согласно данным литературы нейрональные стволовые клетки (НСК, NSCs) и клетки-предшественники (НКП, NPC) обладают регенеративным

потенциалом, что может быть использовано для лечения многих патологий ЦНС, так как эти особые клетки способны дифференцироваться в три типа клеток ЦНС – нейроны, астроциты и олигодендроциты. NPCs развиваются, чтобы генерировать достаточное количество клеток, образуя гетерогенную популяцию клеток с различными соотношениями предшественников с разной клеточной судьбой – предшественники нейронов и предшественники астроцитов [24, 85]. Кроме того, развитие NSCs/NSPC является важным компонентом процессов нейrogenеза, актуального для процессов обучения и запоминания [415].

На самых ранних этапах эмбрионального развития млекопитающих нервная трубка состоит из одного слоя нейроэпителиальных клеток, которые могут подвергаться делению. В эмбриональном нейrogenезе нейроэпителиальные клетки могут следовать симметричному пролиферационному делению, генерируя две дочерние клетки. При дальнейшем развитии, нейроэпителиальные клетки начинают подавлять свои эпителиальные признаки, и происходит постепенное приобретение глиальных свойств, чтобы в конечном итоге становится однородной популяцией радиальной глии. Клетки радиальной глии подвергаются асимметричному дифференцирующему делению, генерируя новую клетку радиальной глии и базальную прогениторную клетку [394]. В ряде работ было обнаружено, что базальная прогениторная клетка дополнительно симметрично делится для генерации двух нейробластов и в конечном итоге дифференцируется в нейроны [228].

По своему определению, стволовые клетки проявляют два основных фундаментальных свойства: (1) самообновление, при котором стволовая клетка производит копию самой себя путем симметричного или асимметричного деления и (2) мультипотентность, при которой стволовая клетка приводит к образованию клетки-предшественника, которая может дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты [279]. Нейrogenез у млекопитающих определяется как процесс, который приводит к

генерации функциональных нейронов из НСК. Этот процесс происходит в четыре этапа: 1) пролиферация клеток; 2) определение клеточной судьбы; 3) миграция клеток; 4) клеточная дифференциация, созревание и синаптическая интеграция в нейрональные цепи [291, 428]. Клетки радиальной глии представляют собой совокупность НСК с радиальной морфологией и глиальными признаками, присутствующими в развивающемся мозге и сохраняющимися в субвентрикулярной и субгранулярной зонах постнатального и взрослого мозга [227]; предшественники являются пролиферирующими клетками с фиксированным потенциалом дифференцировки, т.е. нейронные предшественники имеют ограниченный потенциал для нейронной линии [315].

Было показано, что различные факторы и сигналы регулируют образование, деление и распространение клеток-предшественников, в частности, нейротрансмиттеры, нейропептиды, гормоны, цитокины, а также внешние стимулы, инициирующие процессы обучения, запоминания, выражения эмоций и т.д. [20]. Очевидно, что воспроизведение эффектов всех указанных регуляторных стимулов в условиях *in vitro*, практически, невозможно.

Фенотипирование НСК/НПК осуществляется по оценке экспрессии большого спектра молекул (Таблица 1).

Необходимо учитывать, что развитие стволовых клеток головного мозга осуществляется в пределах т.н. нейрогенных ниш которые, будучи представленными широким спектром клеток (эндотелиальные клетки, астроглия и пр.), обеспечивают формирование микроокружения, способствующего контролируемому и эффективному развитию стволовых клеток [319]. В частности, во взрослом головном мозге стволовые клетки находятся в двух нейрогенных нишах: в субвентрикулярной зоне боковых стенок латеральных желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. Эти области мозга поддерживают нейрогенез на всех этапах развития, однако существуют изменения в микроархитектуре клеток,

экспрессии сигнальных факторов и молекулах ЦНС, которые происходят в течение всей жизни [306].

Таблица 1 – Основные маркеры, экспрессируемые нейрональными стволовыми клетками

	Маркер	Характеристика	Ссылка
1	Nestin	Нейроэпителиальный белок стволовых клеток, промежуточный филаментный белок, который экспрессируется в НСК взрослого головного мозга, незрелых клетках нейрональных клеток и исчезает при дифференцировке. Является необходимым для выживания и самообновления НСК.	[305]
2	Sox2	Транскрипционный фактор, играет жизненно важные роли на разных этапах развития млекопитающих. Sox2 имеет высокую экспрессию в эмбриональных стволовых клетках и НСК взрослого мозга во время развития, а также в клетках, которые дифференцируются по глиальному пути.	[332]
3	Notch 1	Трансмембранный рецептор, который регулирует формирование, миграцию и дифференцировку нейрональных клеток	[291]
4	HES1 and HES3	Транскрипционные факторы, которые поддерживают симметричное деление стволовых клеток.	[176]
5	Vimentin	Белок промежуточных филаментов, который экспрессируется в глиальных клетках. Виментин в основном обнаруживается в радиальной глии и незрелых астроцитах при раннем развитии мозга.	[291]
6	PAX6	Фактор транскрипции Pax6 является многофункциональным в регуляции пролиферации и дифференцировки НСК путем модуляции экспрессии различных молекул. Он обладает способностью определять клеточную судьбу, которая поддерживает выживание отдельных подтипов нейронов в зрелом возрасте.	[386]
7	GFAP	Глиальный фибриллярный кислый белок, представляет собой белок промежуточных филаментов, который функционирует для поддержания механической прочности астроцитов. Кроме того, что это известный маркер астроцитов. Клетки с астроцитарными свойствами могут служить источником новых нейронов во время взрослого нейрогенеза. Возрастающее количество доказательств показывает, что GFAP-позитивные клетки-предшественники могут генерировать специфические типы клеток нейронов при нейрогенезе.	[179]
8	Mash1	Транскрипционный фактор, необходимый для эмбриональной нейрональной дифференцировки. Он экспрессируется не только в промежуточных клетках-предшественниках (клетках типа C), но также в субпопуляции НСК в СГЗ и СВЗ взрослого головного мозга.	[412]

9	GLAST and GLT1	GLAST (также известный как EAAT1) представляет собой специфический для астроцитов глутаматный транспортер, а GLT1 (также известный как EAAT2) является переносчиком глутамата; оба они определены как маркеры глиальной группы. GLAST был обнаружен в большинстве S100 β -положительных клеток в СГЗ. Он изначально экспрессируется на 13-14 день эмбрионального развития мыши и сохраняется во взрослом головном мозге. Тем не менее, GLAST и GLT могут быть обнаружены в НСК.	[441]
---	----------------	---	-------

Именно нейрогенная ниша определяет, делятся или остаются нейрональные стволовые клетки в покое, погибают или пролиферируют, мигрируют или дифференцируются в различные нейрональные клетки [36, 45]. Во время развития ЦНС боковые желудочки нервной трубки в основном состоят из пролиферативных клеток нейроэпителлия. Сегментация и регионализация нервной трубки изменяют и ограничивают нейрогенные области на этапах развития, приводя к появлению ниши, которая варьируется по пространственному признаку, химическому и клеточному составу [66]. Стволовые клетки и предшественники в нейрогенных нишах находятся в контакте со специфическими внеклеточными компонентами, такими как факторы роста, компонентами внеклеточного матрикса и клетками, которые модулируют их деление и дифференцировку.

Физиологические и патологические свойства нейрональных стволовых клеток были хорошо изучены в течение последних 30 лет, главным образом, у животных и, в определенных пределах, у людей. На сегодняшний день, полученные знания доступны для определения цито-архитектурной структуры, клеточных компонентов, времени развития и энергетического обеспечения ниши, а также для изучения терапевтического потенциала и связи между нейронными и иммунными клетками. В последние годы было получено детальное понимание потенциала нейронных стволовых клеток. Становится доступным измерение активности нейрональных стволовых клеток количественно для того, чтобы моделировать *in vitro* или предсказать взаимодействия *in silico*. Информация в этом направлении была выдвинута

уже для других органов, но по-прежнему ограничена для мозга из-за сложности и ограниченной доступности [298].

В целом, основные события, сопровождающие поддержание пула, развитие, дифференцировку НСК в головном мозге в постнатальном периоде, представлены на рисунке (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Основные события нейрогенеза в головном мозге в постнатальном периоде. Оригинальная схема, составленная по данным литературы.

1.1.2. Нейрогенные ниши во взрослом мозге

В мозге взрослого млекопитающего нейрогенез ограничен и продолжается в течение всей жизни в двух регионах: субвентрикулярной зоне (SVZ) боковых желудочков (LV) и субгранулярной зоне (SGZ) зубчатой извилины (DG) в гиппокампе (Рисунок 3).

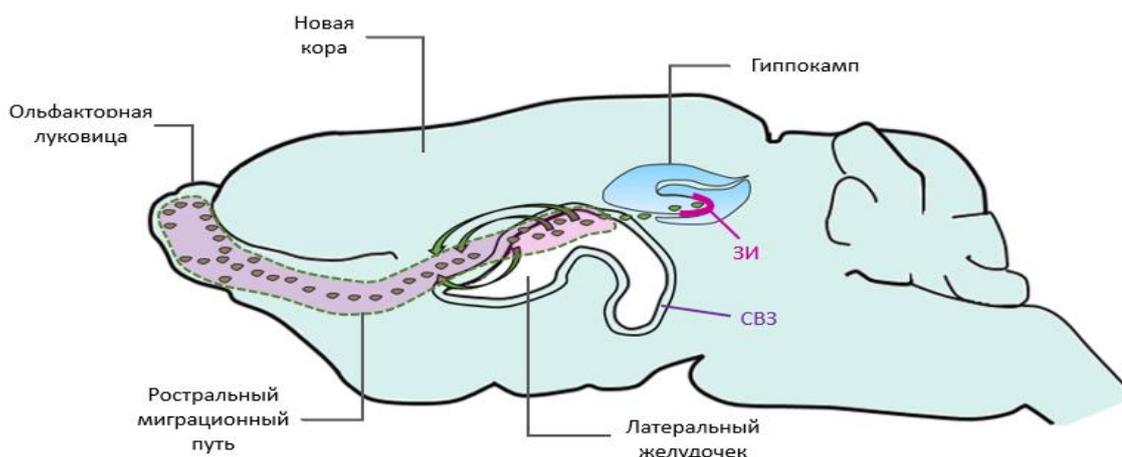


Рисунок 3 – Нейрогенные ниши головного мозга. ЗИ – зубчатая извилина, СВЗ – субвентрикулярная зона. Оригинальный рисунок, составленный по данным литературы.

Модели и стадии развития от НСК до зрелых нейронов были охарактеризованы для двух нейрогенных ниш (SVZ и SGZ). Согласно описанной модели НСК дают рост клеток, называемых нейрональными предшественниками (НПК), также известные как клетки, транзиторные амплифицирующиеся клетки, из-за их ограниченного потенциала деления, которые дифференцируются в мигрирующие нейробласты, а затем в нейроны, которые интегрируются в уже существующие нейронные цепи [126].

Нейробласты в SGZ мигрируют на короткие расстояния и интегрируются в уже существующую цепь гранулярного клеточного слоя (GCL) зубчатой извилины; нейробласты SVZ мигрируют вдоль рострального миграционного пути (RMS) и поставляют вновь образованные нейроны в обонятельную луковицу. Интересно, что глиальные и эндотелиальные клетки также вносят основной вклад в конфигурацию функционально структурированных нейрогенных ниш. Появляется все больше свидетельств того, что мозг взрослого млекопитающего содержит другие нейрогенные ниши, которые способны генерировать новые нейроны и глиальные клетки, особенно после повреждения или после некоторых индуктивных стимулов [250]. Сообщалось также, что неокортекс и гипоталамус поддерживают нейрогенез у взрослых, но степень нейрогенного процесса в этих регионах все еще обсуждается. Хотя функциональное значение нейронов, образованных во взрослом мозге, в физиологических и / или патологических условиях не было

полностью выяснено и продолжает активно изучаться, четко определено, что нейрогенез в SVZ и SGZ мозга взрослого человека зависит от наличия и поддержания НСК, образование которых строго регулируются высокоспециализированными микросредами или нейрогенными нишами [36].

Ниши определяются их способностью анатомически размещать стволовые клетки и функционально контролировать их развитие *in vivo*. Концепция, согласно которой стволовые клетки находятся в определенных нишах, впервые была предложена в 1970-х годах [351], но только в 2000-х годах был достигнут существенный прогресс в описании как клеточных компонентов ниш, так и их функциональных взаимодействий. В мозге взрослого человека достаточно известно о клеточном составе и организации, которые характеризуют нейрогенные ниши SVZ и SGZ [45, 247]. Кроме того, описывается взаимодействие и функциональная координация этих компонентов, а также гетерогенность и сложность нейрогенных ниш и их растущая роль в патологических условиях [25, 36].

На сегодняшний день изучена основная нейробиология нейрогенеза субвентрикулярной и субгранулярных зон. Микроокружение, формируемое в нейрогенных нишах, обеспечивает поддержание популяции нейрональных стволовых клеток и регулирует «принятие решения» этими клетками дифференцироваться по нейронным или глиальным линиям через межклеточные взаимодействия и микросредовые сигналы [140, 185]. Паракринная регуляция клеточных функций поддерживает множество процессов в нейрогенной нише головного мозга [317]. Нейрогенная ниша почти полностью оплетена кровеносными сосудами, и клетки в сосудах вступают в контакт с нишей. Сосудистое микроокружение в нейрогенной нише интегрируется сигнальными молекулами, выделяемыми из эндотелиальных клеток в сосудах мозга или при непосредственном контакте с этими клетками [66] (Рисунок 4).

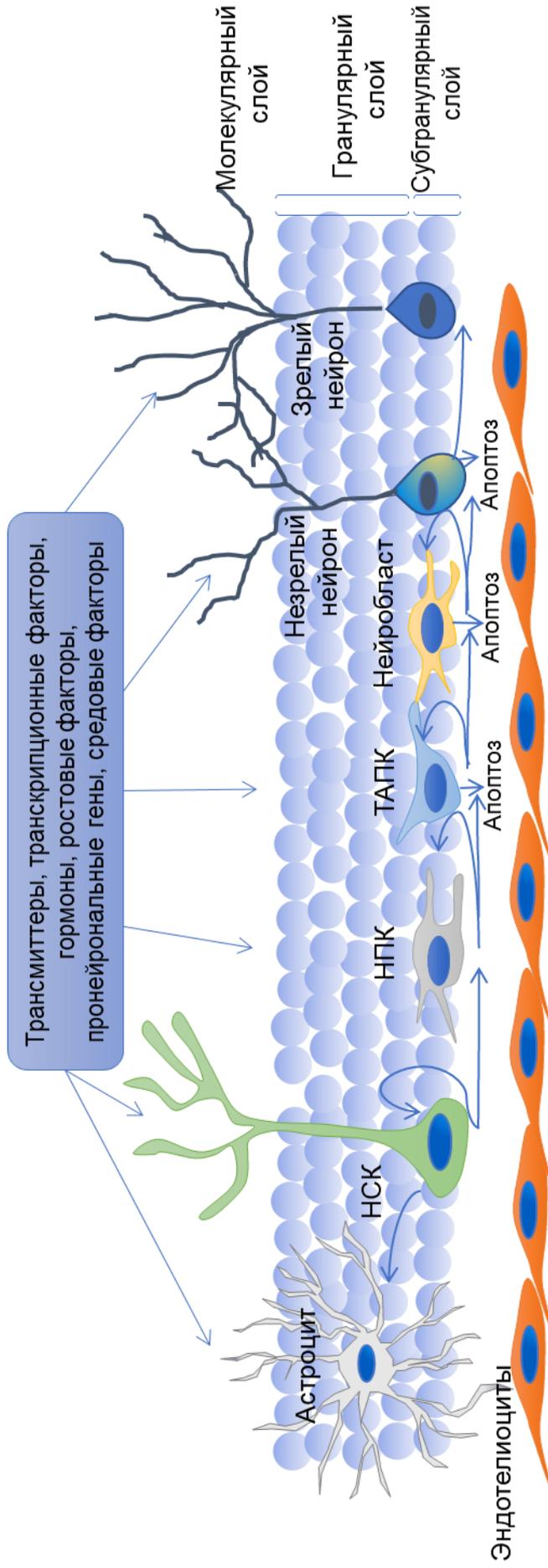


Рисунок 4 – Нейрогенез в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. НСК – нейрональные стволовые клетки, НПК – нейрональные прогениторные клетки, ТАПК – транзиторные амплифицирующиеся прогениторные клетки. Оригинальный рисунок, составленный по данным литературы.

Субвентрикулярная зона (SVZ, СВЗ)

НСК во взрослом мозге сохраняются в узкой части ниши вдоль стенок латеральных желудочков. Стенки желудочков, заполненные спинномозговой жидкостью (СМЖ), окаймленные с одной стороны эпендимальной поверхностью, а с другой – сложным расположением параллельных кровеносных сосудов [271]. НСК, которые находятся в SVZ, также известные как клетки типа В, проявляют гибридные характеристики астроцитов (GFAP+) и незрелых предшественников (S100 β +, Nestin+, Sox2+) [227]. Клетки типа В обычно располагаются под эпендимальной оболочкой левого желудочка, и некоторые из них имеют короткий апикальный отросток с одной первичной ресничкой, которая проецируется через слой эпендимальных клеток для непосредственного контакта со СМЖ, и базальный отросток, который заканчивается на кровеносных сосудах СВЗ-сплетения. Интересно, что апикальные отростки клеток типа В образуют пучки в центре «вертушки» эпендимальных клеток [271]. В результате своего положения и поляризованного фенотипа клетки типа В стратегически расположены для приема сигналов как от сосудов, так и из СМЖ. Покоящиеся клетки типа В могут в конечном итоге делиться асимметрично с образованием транзиторных клеток-предшественников типа С (Mash1+) [268]. Большинство клеток типа С, в свою очередь, делятся, давая рост PSA-NCAM+ нейробластам (клеткам типа А). Клетки типа А образуют кластеры и цепи, которые мигрируют в направлении ольфакторных (обонятельных) луковиц по формируемым астроцитами каналам и параллельным скаффолдом кровеносных сосудов. Анатомическая структура, образованная мигрирующими (типом А) нейробластами, известна как ростральный миграционный путь. В пределах ольфакторных луковиц эти незрелые нейроны дифференцируются в два типа ГМАКергических интернейронов: гранулярные нейроны и перигломерулярные нейроны, которые интегрируются в существующие нейронные схемы. Интересно, что клетки типа В / С также могут образовывать глию (олигодендроциты или астроциты) [36].

Субгранулярная зона

SGZ – это область, расположенная под гранулярным клеточным слоем (GCL) зубчатой извилины гиппокампа. Модель развития от НСК до формирования зрелых нейронов, описанная в SVZ, может быть сравнительно применена к SGZ. Считается, что сходное подмножество GFAP+/Sox2+/Nestin+ радиальных глиоподобных клеток является покоящимся НСК в SGZ. Эти НСК, также известные как клетки типа 1, вызывают асимметричное деление и дают начало транзиторным амплифицирующимся нерадиальным предшественникам (Nestin+/GFAP-) или клеткам типа 2a. Клетки типа 2a впоследствии образуют популяцию промежуточных предшественников (тип 2b), более предрасположенных к нейрональной судьбе, которая приводит к образованию нейробластов (Dcx+) (тип 3). Наконец, нейробласты дифференцируются в созревающие глутаматергические гранулярные клетки, которые мигрируют, управляемые астроцитарными процессами, и интегрируются в гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа [20] (Рисунок 5).

Поскольку гиппокамп играет центральную роль в обучении и памяти, особый интерес представляет функциональный вклад нейрогенеза в субгранулярной зоне. Используя множество подходов *in vivo*, включая нейровизуализацию, электрофизиологию и поведенческие тесты, было хорошо продемонстрировано, что нейрогенез SGZ играет ключевую роль в обучении, памяти и регуляции настроения [63].

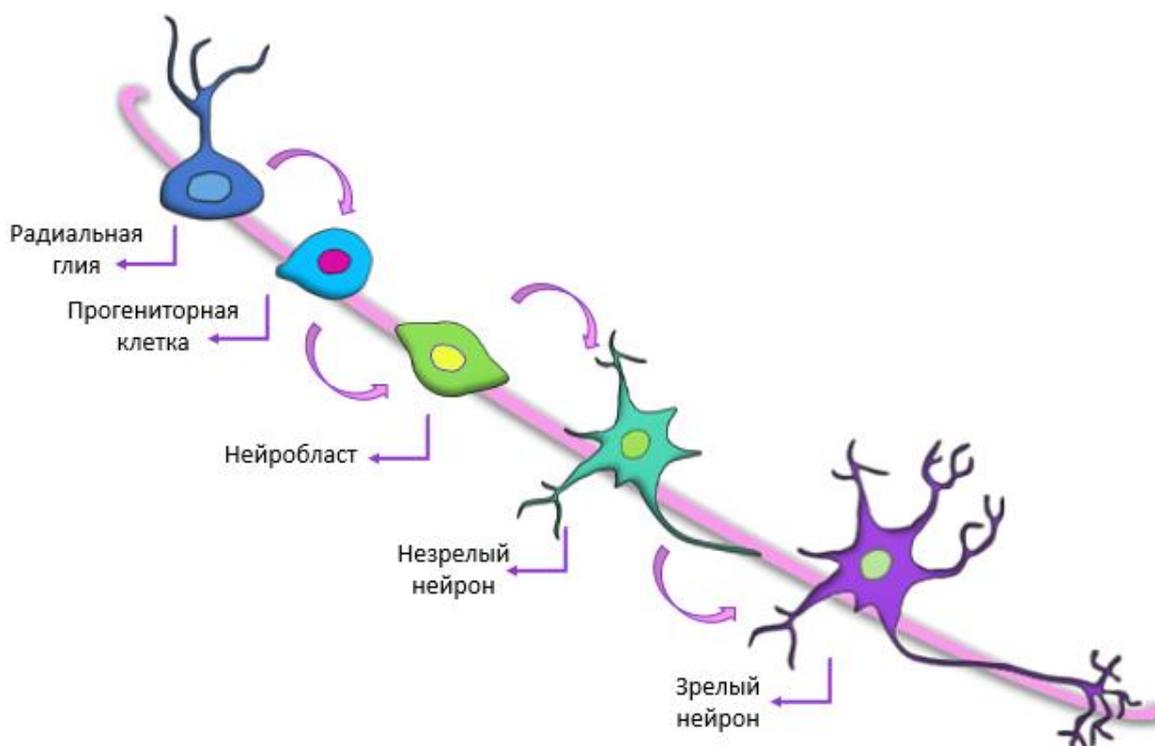


Рисунок 5 – Основные этапы превращения НСК в зрелые нейроны в нейрогенной нише. Оригинальный рисунок, составленный по данным литературы.

1.1.3. Клеточные компоненты нейрогенной ниши и их роль в нейрогенезе

Высоко иерархическая линия нейрональных клеток как в SVZ, так и в SGZ требует точной регуляции самообновления НСК, спецификации судьбы, созревания и интеграции новых нейронов в существующие нейронные схемы. Конвергенция нескольких клеточных и внеклеточных факторов способствует созданию уникальной и специализированной ниши или микросреды, которая регулирует физиологию НСК в течение жизни взрослого человека. Поэтому идентификация и функциональная характеристика этих факторов становится ключевым аспектом не только для лучшего понимания биологии взрослых НСК, но и для разработки новых методов лечения ряда неврологических и психиатрических расстройств, связанных с дефектами нейрогенеза у взрослых. Значительные успехи были достигнуты в описании клеточных компонентов нейрогенных ниш и механизмов, с помощью которых они могут

индивидуально или координированно вносить свой вклад в регуляцию нейрогенеза взрослых [45].

Астроциты

Астроциты представляют собой один из главных клеточных компонентов, вносящих вклад в формирование и функционирование нейрогенных ниш [36, 366]. Совместное культивирование клеток с астроцитами, выделенными из гиппокампа и коры головного мозга взрослых, но не из спинного мозга, индуцирует нейрональную дифференцировку нейрональных прогениторных клеток [292]. Кроме того, астроциты, образованные в гиппокампе, более эффективны, чем кортикальные астроциты, в определении нейрональной судьбы прогениторных клеток [292], предполагая, что функциональная неоднородность астроцитов может отражать уникальные характеристики различных областей или сред мозга. Интересно, что они могут выполнять как положительные, так и негативные регуляторные роли в нейрогенном процессе. Астроциты отрицательно контролируют нейрональную дифференцировку стволовых клеток / клеток-предшественников посредством межклеточных контактов, в которых Jagged1-опосредованный Notch путь и GFAP и виментин играют важную роль [414]. Аналогичным образом, некоторые секретируемые астроцитами факторы, такие как белок 6, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP6) и декорин, ингибируют нейрональную дифференцировку НСК/НПК во взрослом мозге. С другой стороны, положительное влияние на нейрональную дифференцировку НСК в субгранулярном слое зубчатой извилины во взрослом головном мозге включает межклеточный контакт эфрин-B2 (+) астроцитов [32]. Аналогично, высвобождение астроцитарного АТФ положительно регулирует пролиферацию НСК в SGZ [61]. Некоторые растворимые факторы, продуцируемые астроцитами, такие как Wnt3, нейрогенезин-1, тромбоспондин-1 и интерлейкины IL-1 β , IL-6, способствуют нейрогенезу в гиппокампе. В соответствии с положительным регуляторным действием астроцитов, возрастные изменения в популяции астроцитов,

включая снижение количества FGF-2 +астроцитов, коррелируют с низкими уровнями нейрогенеза в гиппокампе в пожилом возрасте [36].

Астроциты также способствуют миграции нейробластов вдоль RMS, создавая и физически ограничивая маршрут или т.н. трубку, где они взаимодействуют с мигрирующими нейробластами и помогают поддерживать архитектуру каркаса сосудистой сети [136]. Точно так же и в субгранулярной зоне астроцитарные радиальные процессы облегчают миграцию вновь генерируемых нейронов на короткие расстояния из SGZ в GCL зубчатой извилины. Кроме того, астроциты гиппокампа у взрослых способствуют созреванию и синаптической интеграции нейрального потомства стволовых клеток в экспериментах с использованием сокультивирования с астроцитами [36].

Микроглия

Большинство клеток микроглии ЦНС уже генерируются к концу второй постнатальной недели [135]. В мозге взрослого человека покоящиеся клетки микроглии представляют собой резидентные макрофаги, и они постоянно контролируют процессы в паренхиме головного мозга. В SGZ гиппокампа микроглиальные клетки играют значимую роль в качестве фагоцитов. Было продемонстрировано, что большинство вновь образованных нейронов SGZ подвергаются апоптозу и фагоцитируются клетками микроглии [364]. Помимо своей роли в головном мозге, клетки микроглии могут также выполнять нейропротекторные или нейротоксические функции в зависимости от физиологических и патологических обстоятельств [58]. Кроме того, клетки микроглии могут взаимодействовать с НСК / НПК [371] и регулировать нейрогенез у взрослых, секретировав несколько растворимых медиаторов, таких как факторы роста и цитокины, которые влияют либо положительно, либо отрицательно на нейрогенный процесс [160]. Эксперименты *in vitro* позволяют предположить, что секретируемые микроглией факторы способствуют нейрональной дифференцировке полученных из SVZ нейрональных стволовых клеток, но не их поддержанию или самообновлению. С другой

стороны, активация клеток микроглии может привести к негативным регуляторным воздействиям на нейрогенный процесс в SGZ [120]. Например, воспалительная или LPS (липополисахарид)-опосредованная активация микроглии может ингибировать нейрогенез и способствовать глиогенезу, и этот эффект частично опосредуется секрецией провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α . С другой стороны, когда микроглиальные клетки стимулируются интерлейкином-4 (IL-4) и интерфероном- γ , они секретируют инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) и индуцируют нейрональную дифференцировку нейральных предшественников [36]. Кроме того, средовой контекст нейрогенной ниши определяет не только способ активации клеток микроглии и положительные или негативные регуляторные действия этих клеток как популяции, но также определяет про- или антинейрогенные свойства специфических микроглиальных секретируемых цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста β (TGF- β). Интересно, что стимулированная физическими нагрузками (бегом) пролиферация клеток и нейрогенез в SGZ [20] связаны со снижением функции микроглии. И наоборот, возрастные изменения в активности микроглии, включая увеличение их реактивного профиля с более высокой секрецией провоспалительных цитокинов, потенциально способствуют снижению нейрогенеза, наблюдаемого при старении [131].

Эндотелиальные клетки и перициты

Тесный контакт НСК / НПК с кровеносными сосудами в обеих нейрогенных нишах взрослого головного мозга позволяет предположить, что определенные факторы, исходящие из сосудистой сети, могут действовать как основные модуляторы нейрогенного процесса, и, следовательно, некоторые авторы считают SVZ и SGZ «сосудистыми нишами» [247]. Интересно, что сосудистые сигналы или мессенджеры могут возникать удаленно, в периферических органах (переносимых кровью веществах) и / или локально из эндотелиальных клеток и перицитов (паракринная связь). Эндотелиальные клетки способны секретировать несколько факторов, которые модулируют

нейрогенез во взрослом мозге. Некоторые исследования показывают, что образуемый эндотелиальными клетками нейротрофический фактор мозга (BDNF) и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) стимулируют нейрогенез SGZ как *in vivo*, так и *in vitro*. Интересно, что эндотелиальные клетки и НСК взаимно влияют друг на друга, связывая нейрогенез в субгранулярной зоне с ангиогенезом, и предполагается, что VEGF имеет решающее значение для координации этих процессов. Кроме того, VEGF, по-видимому, необходим для SGZ нейрогенеза, стимулированного физическими упражнениями. Вместе с эндотелиальными клетками эндотелиальные клетки секретируют фактор пигментного эпителия (PEDF) и, таким образом, стимулируют самообновление НСК [29]. Нейротрофин-3 (NT3) и бетацеллюлин, секретируемые эндотелиальными клетками сосудов как SVZ-сплетения, так и сосудистого сплетения, регулируют нейрогенез в SVZ с помощью различных механизмов. NT3 помогает поддерживать популяцию покоящихся НСК [92], тогда как бетацеллюлин способствует пролиферации НПК и нейробластов [143]. Сосудистые эндотелиальные клетки также секретируют хемокин, известный как CXCL12, который дифференциально модулирует НСК [36].

Роль перицитов во взрослых нейрогенных нишах менее изучена. Находясь в тесном контакте с эндотелиальными клетками, они могут действовать как регуляторы или преобразователи как кровеносных сигналов, так и факторов, происходящих из эндотелия. Перициты секретируют TGF- β , известный модулятор нейрогенеза и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Они также выделяют нейротрофины в ответ на гипоксические условия [186]. В дополнение к их потенциальной паракринной функции было продемонстрировано, что перициты остаются относительно недифференцированными, сохраняя способность дифференцироваться в несколько типов клеток, включая нейроны. Следовательно, было предложено, что перициты могут функционировать как НСК при определенных обстоятельствах. С другой стороны, перициты могут участвовать в патогенезе

различных заболеваний ЦНС и могут быть предложены в качестве потенциальной терапевтической мишени [236].

1.1.4. Идентификация процессов нейрогенеза

Важно кратко суммировать методы идентификации новых нейронов, поскольку методы, используемые для маркировки делящейся и созревающей клетки, часто влияют на характер и интерпретацию экспериментов, описанных ниже. Наиболее распространенный метод маркировки делящихся клеток включает в себя включение отслеживаемой молекулы в ДНК. Поскольку синтез ДНК обычно ограничивается митозом, по крайней мере, на измеримых уровнях, это используется в качестве маркера нейрогенеза. В первых исследованиях нейрогенеза использовался тритированный (3H) тимидин, позволяющий проводить радиографическое отслеживание клеток, которые образовались во время инъекции. В 1990-х годах был разработан еще один аналог тимидина, BrdU (бромдезоксисуридин), поскольку эту молекулу можно было обнаружить с помощью иммуногистохимии. Это открытие было важным достижением, поскольку иммуноокрашивание может позволить идентифицировать судьбу делящихся клеток посредством совместного окрашивания других маркеров, таких как нейрональный маркер NeuN или глиальный маркер – глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Мечение BrdU остается широко используемым, как и его родственные молекулы IdU и CldU (йодидный и хлоридный эквиваленты соответственно), в значительной степени потому, что с его помощью можно измерять как скорость пролиферации, так и выживаемость и миграцию клеток [20].

Другие иммуногистологические маркеры могут быть использованы для идентификации пролиферирующих клеток; для характеристики нейрогенеза наиболее широко используется Ki67. Аналогично, существует несколько маркеров для определенных фаз стволовых клеток, таких как Sox-2, Nestin и

другие. Генетические исследования, такие как системы cre-lox, в которых временно активированный промотор постоянно метит нейрон маркером, таким как lacZ или зеленый флуоресцентный белок (GFP), все чаще используются для долгосрочной количественной оценки. Наконец, наиболее распространенным подходом является ретровирусная маркировка делящихся клеток маркером, таким как GFP [20].

1.1.5. Роль внешних молекулярных сигналов на формирование микроокружения в нейрогенной нише

Считается, что изменения в микроокружении также могут способствовать прогрессирующему нарушению нейрогенеза у взрослых особей, наблюдаемому во время старения, хотя остается неясным, как внеклеточные сигналы могут влиять на внутренние пути НСК, ассоциированные с возрастом [260].

Как известно, НСК содержатся в специализированном микроокружении, где они получают и интегрируют множество сходящихся внеклеточных факторов, чья динамически регулируемая продукция может регулировать пролиферацию и дифференцировку НСК в нейроны, даже в довольно «антинейрогенной» среде мозга взрослого человека [72]. Примечательно, что трансплантированные за пределы своих ниш в неповрежденные области головного мозга НСК преимущественно дифференцируются в глиальные клетки. На внеклеточную среду субвентрикулярной зоны оказывает влияние спинномозговая жидкость на апикальной стороне ниши, а также взаимодействие с эндотелиальными клетками кровеносных сосудов, проходящих по базальной стороне ниши, и ненейрогенные типы клеток, такие как астроциты и микроглия [249].

Следует отметить, что системные изменения в циркулирующих факторах в кровотоке могут также влиять на нейрогенез у взрослых.

Исследование, основанное на инъекции плазмы или гетерохронном парабриозе, экспериментальной процедуре, которая создает общую систему кровообращения между двумя животными разного возраста, продемонстрировало, что циркулирующие факторы влияют на нишу NSPC. Это исследование показывает, что возрастные изменения уровней нескольких циркулирующих молекул могут влиять на функцию мозга и нейрогенез взрослого человека и предполагают, что воздействие на циркулирующую среду может ослабить функциональный дефицит, связанный со старением. [249].

Глиальные клетки, такие как микроглия и астроциты, являются неотъемлемыми клеточными элементами ниши, выступая в качестве ключевых игроков в модуляции нейрогенеза у взрослых. Так называемая молчаливая микроглия контролирует нейрогенез и оказывает про- или антинейрогенное действие в зависимости от статуса активации. Старение способствует преобладанию нейровоспалительного статуса в головном мозге, связанного с неоднородной, зависящей от региона модификацией фенотипа микроглии [151].

Предполагается, что продолжающаяся интеграция новых нейронов в цепи гиппокампа в течение всей взрослой жизни влияет на функцию памяти двумя способами. Во-первых, недавно интегрированные нейроны обеспечивают новые субстраты для обучения и, следовательно, могут способствовать формированию новых воспоминаний (например, путем увеличения емкости или обеспечения более эффективного разделения паттернов). Эта точка зрения подтверждается исследованиями, показывающими, что подавление нейрогенеза гиппокампа обычно ухудшает формирование новой памяти [451], тогда как усиленный нейрогенез в гиппокампе может улучшить приобретение памяти [221]. Во-вторых, изменяя схему входных и выходных соединений зубчатой извилины, интеграция новых нейронов изменяет нейрональные цепи гиппокампа и, следовательно, может

затруднить доступ к памяти, уже сохраненной в этих цепях в более поздние моменты времени [127].

В то время как формирование и первоначальная экспрессия воспоминаний о событиях зависят от гиппокампа, со временем контекстные воспоминания о страхе становятся менее зависимыми от гиппокампа по своей экспрессии и более зависимыми от коры. Например, когда крысы узнают связь между контекстом и шоком, повреждение гиппокампа через 1 день после тренировки вызывает потерю этой контекстуальной памяти страха. Тем не менее, подобные поражения в более отдаленные моменты времени не имеют никакого эффекта. Этот паттерн временной градиентной ретроградной амнезии после повреждения гиппокампа показывает, что по мере того, как контекстуальные воспоминания страха созревают и успешно консолидируются в коре, они должны стать менее уязвимыми для опосредованного нейрогенезом забывания [127].

1.1.6. Регуляция процессов нейрогенеза. Влияние обучение на нейрогенез

Как описано выше, созревание взрослых гранулярных клеток, как правило, имитирует процесс созревания нейронов, наблюдаемый в процессе эмбрионального развития, хотя и в более медленном масштабе времени. То же самое относится к динамике и регуляции транскрипции генов в созревающих гранулярных клетках. Многие из профилей экспрессии генов, наблюдаемых в процессе развития, также очевидны в гранулярных клетках, образованных во взрослом головном мозге, и эти генетические конфигурации являются неотъемлемой частью регуляции процесса созревания. Регуляция нейрогенеза может быть направлена на несколько этапов всего процесса. Стволовые клетки проходят через несколько различных морфологически и генетически идентифицируемых стадий, прежде всего стадию медленно делящихся

стволовых клеток и более быстро пролиферирующую стадию нейральных предшественников [315].

Регуляция осуществляется нейромедиаторами, а также путем локальной сигнализации и внешними факторами, такими как обогащенная среда, возраст, стресс, диета, обучение [34].

Одним из следствий роли нейрогенеза у взрослых в обучении и памяти является то, что нейрогенез может регулироваться многочисленными факторами, связанными с поведенческими и когнитивными состояниями животного. Действительно, опыт животного, включая гиппокамп-зависимое обучение, обогащение окружающей среды и произвольный бег, может влиять на скорость нейрогенеза [248].

Поведенческие стимулы и нейрональная активность могут модулировать выживание и интеграцию НСК, однако остается до конца неизученным вопрос, как реагируют НСК на такие стимулы. Этот вопрос обычно решается путем изучения экспрессии непосредственно генов раннего реагирования (IEG). IEG, такие как онкоген остеосаркомы FBJ (Fos), белок, регулирующий активность, связанный с цитоскелетом (Arc), ген раннего ответа на рост 1 (Egr1; также известный как Zif268) и Homer1A, играют ключевую роль в регуляции синаптической пластичности. Их экспрессия тесно связана с нейрональной активностью, связанной с обучением и памятью, и широко используется для изучения популяционной активности нейронов в различных областях мозга. Используя BrdU для мечения даты рождения гранулярных нейронов, было обнаружено, что нейрональная активность (как на физиологическом, так и на аберрантном уровнях) не вызывает экспрессию IEG в взрослых гранулярных клетках, пока они не достигают определенной стадии созревания - около 3-4 недельного возраста у мышей и около 2 недель у крыс [315].

Интересно, что первоначально одной из наиболее противоречивых взаимосвязей между поведением и нейрогенезом было влияние обучения на новые нейроны. В то время как существует значительное исследование

влияния новых нейронов на гиппокамп-зависимое обучение, исследования влияния самого обучения на пролиферацию и выживание новых нейронов первоначально продемонстрировали противоречивые результаты. Эта первоначальная путаница, вероятно, проистекает из двух вещей: 1) не все парадигмы и задачи обучения эквивалентны, и 2) эффект обучения кажется сложным во времени, поскольку обучение способствует выживанию некоторых молодых нейронов, в то же время подавляя выживание ранее образованных нейронов [315].

Последующие исследования также показали, что влияние обучения на нейрогенез довольно сложное. Интересно отметить, что негативное влияние обучения на выживание, кажется необходимым для выполнения задачи, предполагая, что связь между обучением и выживанием является чрезвычайно важной. Обучение влияет не только на выживаемость клеток, но и на созревание новых нейронов, а обучение в водном лабиринте Морриса увеличивает сложность дендритной доработки и плотность синапсов гранулярных клеток. Действительно, этот эффект обучения, по-видимому, влияет на то, на что в конечном итоге реагируют нейроны [20].

Гиппокамп-зависимое обучение является одним из основных регуляторов нейрогенеза гиппокампа. Например, изучение задач, зависящих от гиппокампа, а не задач, не зависящих от гиппокампа, увеличивает количество гранулярных нейронов в зубчатой извилине примерно в течение 1 недели. Тем не менее, на распространение НСК в СГЗ сразу после обучения такого эффекта не наблюдали [27].

Даже среди исследований, в которых использовались те же тесты для изучения когнитивных эффектов на нейрогенез в гиппокампе, данные могут быть противоречивыми. Тест «Водный лабиринт Морриса» является одним из наиболее часто используемых тестов для функциональной оценки нейрогенеза. Кроме того, нейрогенез в гиппокампе тонко регулируется изучением пространственной навигации в водном лабиринте Морриса. Например, обучение в ВЛМ способствует выживанию нейронов зубчатой

извилины, которые образовались за 7 дней до начала обучения в данном тесте, и в то же время вызывает апоптоз нейронов, которые были образованы за 3 дня до этого [100]. Следует отметить, что в начале обучения ВЛМ стволовые клетки, образованные за 1 неделю, начали формировать ГАМКергические синапсы с локальной сетью и переходить в гипервозбудимую стадию во время обучения в ВЛМ, и поэтому они могут потенциально зависеть от обучения. Кроме того, поздняя фаза тренировки в водном тесте, когда животные демонстрируют незначительное улучшение его выполнения, связана с повышенным апоптозом в зубчатой извилине и уменьшением количества нейронов, сформированных на ранней стадии обучения. В то же время такая тренировка вызывает пролиферацию НСК в СГЗ. Вместе эти результаты показывают, что обучение выборочно добавляет и удаляет НСК в соответствии с их зрелостью и функциональной значимостью [93].

Удивительно, что явный дефицит в обучении в области пространственной навигации, измеряемый увеличением латентного времени входа или расстоянием, пройденным для достижения скрытой платформы, был обнаружен только в двух исследованиях на мышах с использованием генетической абляции нейрогенеза, но не в исследованиях с использованием других методов нокдауна для предотвращения нейрогенеза [179].

Тем не менее, многие исследования показали нарушения в долгосрочной, но не кратковременной задержке пространственной памяти как следствие снижения нейрогенеза у взрослых особей. Точно так же были получены противоречивые данные о роли нейрогенеза в формировании контекстуального страха, что является еще одним широко используемым тестом оценки гиппокамп-зависимого обучения и памяти. Нарушения выполнения данного теста неоднократно наблюдались у грызунов, у которых нейрогенез был почти полностью подавлен путем облучения и у двух линий трансгенных мышей с генетической абляцией нейрогенеза. Тем не менее, такие дефекты не были обнаружены в нескольких других исследованиях на

грызунах, в которых нейрогенез подавлялся с использованием различных методов [237].

Нейрогенез гиппокампа можно модулировать с помощью других манипуляций, включая системное введение фармакологических агентов, таких как нейротрофические факторы, фактор роста эндотелия сосудов, а также путем удаления Toll-подобных рецепторов 3. Увеличение нейрогенеза в гиппокампе у этих животных связано с улучшением памяти и их способности к обучению, в таких тестах, как условно-рефлекторное замирание, ассоциативное пассивное избегание и водный лабиринт Морриса [293].

Тест «Условно-рефлекторного замирания» является важным поведенческим подходом в широком спектре научных исследований в области неврологии. Исследователи из разных областей все чаще обращаются к тесту по формированию страха, чтобы исследовать поведенческие и когнитивные фенотипы после фармакологических, генетических и других экспериментальных манипуляций. Соотнесение страха с задержкой тона стало широко используемым подходом, поскольку оно позволяет оценивать «гиппокампазависимый» тоновый страх и «гиппокампазависимый» контекстный страх у одного и того же животного. Основным преимуществом этой процедуры является то, что эти два различных типа страха могут быть проверены независимо друг от друга. В процедуре формирования тонового страха страх одновременно приобретает как по тону, так и по контекстуальным сигналам. Было показано, что при формировании тона с задержкой усвоение тонового страха зависит от синаптической пластичности слуховых входов в миндалину. Приобретение контекстуального страха зависит от синаптической пластичности в миндалине, а также от дополнительных нейронных субстратов, таких как гиппокамп, который, как считается, опосредует интеграцию мультимодальных сигналов в «контекстное представление», которое может функционировать в качестве условного стимула (CS) для миндалевидных цепей. Боязнь контекста оценивается путем возвращения животного в исходный обучающий контекст для «контекстного

теста». Тоновый страх обычно оценивается путем помещения животного в совершенно иной контекст, где тон представлен во время «тестового тона». Основная поведенческая мера страха – это процент времени, в течение которого животное «замирает», что является защитной реакцией грызунов, для которой характерна полная неподвижность. Различия в уровне замирания во время предоставления звука используются для определения изменений в приобретении или выражении тонального страха [187].

Таким образом, за последнее десятилетие понимание роли нейрогенеза у взрослых в обучении и формировании памяти развивалось в нескольких направлениях. Знание клеточных и синаптических свойств, лежащих в основе пластичности и обработки сигналов новых нейронов, было расширено в результате усовершенствованных электрофизиологических исследований. Концепция критического периода для нейронов была расширена таким образом, чтобы охватить различные периоды развития нейронов. Следовательно, чувствительность молодых и зрелых нейронов к обучению варьируется в зависимости от стадии созревания новых нейронов. Список поведенческих тестов, зависящих от нейрогенеза, был расширен, поэтому теперь кажется, что почти все тесты, зависящие от гиппокампа, по-видимому, хотя бы частично, зависят от нейрогенеза. Обратная зависимость нейрогенеза от обучения была показана на удивление сложной. Это подчеркивается исследованиями, показывающими, что в некоторых случаях обучение может усиливать нейрогенез, но в других оно может тормозить его. Тем не менее, сама область изучения нейрогенеза у взрослых особей достигла определенной зрелости, поэтому сейчас почти невозможно представить роль гиппокампа в обучении и памяти, не рассматривая нейрогенез у взрослых в качестве неотъемлемой части. В дальнейшем предполагается, что новые перспективы, открывшиеся в результате недавних исследований, будут направлять не только наше понимание нейрогенного процесса, но и наше понимание гиппокампа в целом [98].

1.1.7. Роль нейрогенеза во время обучения

В гиппокампе находится одна из немногих нейрогенных ниш в мозге взрослого человека – субгранулярная зона зубчатой извилины. Функциональное значение нейронов, образованных у взрослых, в этом регионе было охарактеризовано с помощью контекстной подготовки в тесте условно-рефлекторного замирания, где животные учатся ассоциировать местоположение с опасностью. Абляция или молчание нейронов ухудшает как приобретение, так и извлечение памяти в условиях парадигмы условно-рефлекторного замирания, что позволяет предположить, что эти нейроны вносят важный вклад в формирование памяти в гиппокампе. Последние данные указывают на то, что взрослые нейроны в дорсальном и вентральном гиппокампе способствуют как приобретению памяти, так и восстановлению [182].

Основная функция, которая больше всего ассоциируется с нейрогенезом у взрослых – это разделение шаблонов. Исследования поведения грызунов предоставили убедительные доказательства связи между нейрогенезом и задачами, связанными с пространственным различием [20].

Учитывая, что нейрогенез происходит в гиппокампе, критической области мозга для декларативной памяти у людей, долгое время считалось, что новые нейроны должны способствовать гиппокамп-зависимому обучению и памяти. С использованием метилазоксиметанола ацетата (МММ), метилирующего ДНК-агент, для подавления нейрогенеза, впервые было показано, что нейрогенез гиппокампа является критическим для формирования гиппокамп-зависимой ассоциативной памяти страха и является необязательным для формирования независимой от гиппокампа памяти. Тем не менее, более поздние исследования последствий абляции нейрогенеза у взрослых с использованием облучения или других неспецифических методов показали довольно противоречивые данные, возможно, из-за

неспецифической природы подходов аблации нейрогенеза, используемых поведенческих анализов и изменений в экспериментальных условиях от исследования к исследованию. Последние исследования с использованием более специфических методов манипуляций с нейрогенезом и поведенческих задач, направленных на изучение функций, связанных с зубчатой извилиной, не только установили роль нейронов, образованных во взрослом головном мозге, в гиппокамп-зависимом обучении и памяти, но также выявили несколько ключевых функциональных особенностей нейрогенеза у взрослых [93].

Во-первых, как описано выше, нейрогенез у взрослых, по-видимому, необходим для разделения паттернов, что в настоящее время описывается как ключевая функция зубчатой извилины. Эта критическая роль для нейрогенеза у взрослых была выявлена с помощью заданий, которые проверяли способность животных различать близко расположенные пространственные положения или сходные контексты [94].

Во-вторых, нейрогенез у взрослых особей более критично вовлечен в распознавание во времени. У мышей с нейронами, которые были образованы после приобретения контекстуальных или пространственных воспоминаний обнаружилось ухудшение поведенческих характеристик при отзыве этих воспоминаний [153].

В-третьих, нейрогенез у взрослых также необходим для долгосрочной консолидации контекстной памяти. После формирования контекстуальной памяти страха воспоминание о страхе изначально зависит от гиппокампа, но через несколько недель становится независимым от гиппокампа. Китамура и соавт. [218] показали, что удаление нейрогенеза с помощью облучения продлевает зависимость гиппокампа от контекстной памяти страха у мышей, что указывает на роль нейрогенеза в содействии консолидации системной памяти. Учитывая, что гиппокамп считается местом временного хранения памяти, нейрогенез может служить механизмом для забывания в гиппокампе

посредством общего ретроактивного вмешательства, независимо от содержимого памяти [121].

В-четвертых, взрослые нейроны на разных стадиях созревания могут вносить различный вклад в обучение и память, учитывая различия в их физиологических характеристиках. Сокращая количество взрослых гранулярных клеток на разных стадиях созревания у трансгенных мышей Nestin-*tk*, было обнаружено, что незрелые взрослые гранулярные клетки, но не их зрелые аналоги, необходимы для обучения и памяти [286].

Помимо своей роли в обучении и памяти, гиппокамп участвует в эмоциональной регуляции. Вместо единой структуры функциональная роль гиппокампа изменяется вдоль его дорсовентральной оси, причем дорсальная и вентральная части участвуют в когнитивной и эмоциональной функциях соответственно. Ранние исследования нейрогенеза гиппокампа также выявили корреляцию между скоростью нейрогенеза и эмоциональным статусом, с повышенным нейрогенезом, наблюдаемым у животных, получавших антидепрессант, и сниженным нейрогенезом у стрессированных животных. Поэтому было высказано предположение, что нейрогенез гиппокампа у взрослых также может быть важным аффективным регулятором. [20].

В связи с этим на сегодняшний день остается весьма актуальным изучение не только самого нейрогенеза, но и особенностей формирования локального микроокружения в норме, при влиянии внешних факторов, а также развитии нейродегенерации.

1.2. Болезнь Альцгеймера и влияние нейродегенерации на нейрогенез

1.2.1. Болезнь Альцгеймера: определение, распространённость, общая характеристика

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, приводящее к снижению когнитивных функций, психоневрологическим симптомам, инвалидности и в, конечном итоге, преждевременной смерти [4]. БА является наиболее распространенной причиной деменций, и ее показатели заболеваемости экспоненциально увеличиваются с возрастом [24, 105]. К 2050 году число людей в возрасте 65 лет и старше с БА может почти утроиться с 5,4 миллиона до прогнозируемых 13,8 млн, если не будет медицинского прорыва, направленного на предотвращение и лечение данной патологии. Прогнозируется, что заболевание затронет 1 из 85 человек во всем мире 2050 [146].

Невропатологические отличительные признаки БА представляют собой диффузные амилоидные бляшки, которые часто окружены дистрофическими нейритами, и внутриклеточные нейрофибриллярные клубки (NFT), соответственно состоящие из амилоида β ($A\beta$) и гиперфосфорилированный тау-белок, ассоциированный с микротрубочками [10, 287]. Кроме того, доминантные мутации были обнаружены в гене белка-предшественника амилоида (APP) и гене пресенилина 1 и 2 (PSEN1 и PSEN2) [13], которые кодируют компоненты гамма-секретазы, что приводит к раннему началу БА [11, 138]. APP расщепляется бета-секретазой и гамма-секретазы последовательно для продукции $A\beta_{1-40}$ и $A\beta_{1-42}$ амилоидных пептидов, соответственно, которые накапливаются и образуют амилоидные бляшки [343]. Исследования с момента открытия $A\beta$ и тау-белка предоставили подробную информацию о молекулярных патогенетических событиях, но мало что известно о причинах БА [14], а также о возможном эффективном лечении данной патологии [12, 350]. Появляющиеся данные свидетельствуют

о том, что воспаление играет ключевую роль в патогенезе различных неврологических расстройств и понимании взаимодействий между иммунной системой и нервной системой, что может быть ключом к предотвращению или отсроченной манифестации большинства заболеваний центральной нервной системы (ЦНС). Нейровоспаление, специализированный иммунный ответ центральной нервной системы, был связан с началом некоторых хронических дегенеративных заболеваний ЦНС, характеризующихся прогрессирующей гибелью нейронов в определенных областях ЦНС [55].

Эта потеря нейронов, по-видимому, является причиной когнитивных нарушений, которые характеризуют нейродегенеративные заболевания. Воспаление мозга сопровождает многие заболевания, в том числе боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона и, в частности, болезнь Альцгеймера [391]. Все большее число исследований предполагает сильную корреляцию между ROS -индуцированная оксидативной стрессовой дисфункции белка и патогенезом БА. Действительно, мозг обладает большой потенциальной окислительной способностью, но ограниченной способностью противодействовать окислительному стрессу [70]. Кроме того, митохондриальный окислительный стресс происходит на ранней стадии БА, способствуя патогенезу нейродегенерации. С прогрессированием заболевания, А β повреждает митохондрии, способствуя образованию супероксида и, следовательно, вызывая окислительный стресс, который затем приводит к редокс-опосредованным изменениям клеточной передачи сигналов, такие как путь cJun NH₂-терминальной киназы (JNK) -митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), связанный с активацией ядерного фактора кВ (NF-кВ) и высвобождения провоспалительного интерлейкина (IL) и цитокинов [380].

В течение последних 25 лет было разработано множество линий трансгенных мышей, которые частично воспроизводят основные отличительные признаки БА. На neuropathological уровне в этих моделях фиксируется внеклеточное отложение амилоидных (А β) пептидов в форме

бляшек, а также внутриклеточное накопление и гиперфосфорилирование тау-белка [233]. Многочисленные исследования, описанные в литературе, сообщают о положительном влиянии физических упражнений на различные функции мозга и благоприятном влиянии на пластичность мозга, облегчая нейрогенеративные, нейроадаптивные, а также нейропротективные процессы. К ним относятся усиление когнитивных функций познания и некоторых типов обучения. С помощью методов нейровизуализации было продемонстрировано, что аэробные физические упражнения представляют собой достаточный инструмент для увеличения объема гиппокампа, что приводит к снижению атрофии гиппокампа у людей с генетическим риском возникновения БА. Это в основном связано с повышенным высвобождением нейротрофических факторов и усилением ангиогенеза, способствующих усиленному нейро- и синаптогенезу [301]. Тщательному анализу были подвергнуты трансгенные мыши с БА в отношении опосредованного физическими упражнениями воздействия на отложение амилоид- β ($A\beta$) пептидов и влияние на нейрогенез в гиппокампе и когнитивную функцию [340].

1.2.2. Изменения в нейрогенезе при болезни Альцгеймера

Широко признано, что нейрогенез в гиппокампе играет необходимую роль в поддержании способности к обучению и памяти в зависимости от правильного функционирования нейрональных сетей гиппокампа. Роль нейрогенной ниши при болезни Альцгеймера представлена на рисунке 6 (Рисунок 6).

Новообразованные нейроны в субгранулярной зоне зубчатой извилины становятся включенными в функциональную локальную сеть и могут быть идентифицированы с использованием различных маркеров или методов маркировки (например, бромодезоксиуридин (BrdU)) [93]. Несмотря на то, что

имеется лишь небольшое количество противоречивых исследований о степени нейрогенеза гиппокампа у взрослых у пациентов с БА [416], в последние годы было опубликовано множество исследований о роли нейрогенеза в моделях трансгенных мышей с БА, экспрессирующих APP [6, 417].



Рисунок 6 – Роль нейрогенной ниши в норме и при болезни Альцгеймера. Оригинальный рисунок, составленный по данным литературы.

Процессинг белка-предшественника амилоида (APP)

Ген APP человека расположен на 21 хромосоме. Альтернативный сплайсинг дает 8 изоформ, которые экспрессируются специфичным в зависимости от типа клеток образом, причем APP695 является наиболее распространенным транскриптом в нейрональных клетках. APP может подвергаться различным стадиям расщепления, осуществляемым определенными секретазами, которые приводят к амилоидогенному и неамилоидогенному процессингу [290]. В пути амилоидогенного процессинга APP первоначально расщепляется β -секретазой, что приводит к высвобождению длиннорастворимого внеклеточного фрагмента (sAPP β) и мембраносвязанного С-концевого участка (β -CTF или C99), содержащего A β домен. Последующее внутримембранное расщепление γ -секретазой приводит

к освобождению A β домена, а также внутриклеточного домена APP, называемого AICD. Альтернативно, первоначальное расщепление α -секретазой в домене A β предотвращает образование A β пептида путем высвобождения более короткого растворимого фрагмента APP (sAPP α). После расщепления γ -секретазой снова высвобождается фрагмент AICD, а также другой небольшой пептид p3 с неизвестной до сих пор функцией [290].

Большинство описанных моделей трансгенных мышей с БА включают гиперэкспрессию семейных мутантных генов, ассоциированных с БА (белок-предшественник амилоида (APP), пресенилин 1/2 (PSEN1 / 2)) и отличаются экспрессией как одного, так и нескольких трансгенов, а также в использовании различных мутаций и промоторных конструкций, используемых для управления экспрессией трансгена. В преобладающем числе исследований описано возраст-ассоциированное увеличение накопления A β пептидов связанное с общим снижением нейрогенеза. В одном из самых ранних сообщений, 12-14-месячным мутантным APP трансгенным и подобранным по возрасту контрольным мышам ежедневно вводили аналог тимидина BrdU в течение 5 последовательных дней, и их декапитировали либо через один, либо через 12 дней после последней инъекции. Нейропатологический анализ выявил наличие многочисленных отложений амилоида в гиппокампе, а стереологическая количественная оценка показала значительное уменьшение количества BrdU-позитивных клеток у трансгенных по сравнению с контрольными мышами. Интересно, что такого различия не было обнаружено у 3-месячных мышей, у которых еще не было обнаружено внеклеточного амилоидного отложения [165]. Впоследствии были опубликованы соответствующие наблюдения у стареющих APP/PS1 Δ Ex9 мышей, у которых также наблюдалось снижение количества BrdU- или Doublecortin (DCX)-позитивных клеток в возрасте 9 месяцев, при этом никаких различий по сравнению с мышами дикого типа (WT) в возрасте 5 месяцев при отсутствии явной амилоидной патологии гиппокампа обнаружено не было [381]. Широко используемая модель БА на мышах Tg2576 приводит к развитию возраст-

зависимого амилоидоза в гиппокампе и коре в возрасте 9–12 месяцев. Количественное определение нейрогенеза у взрослых выявило значительно увеличенное количество пролиферирующих BrdU-позитивных клеток у 3-месячных Tg2576 мышей по сравнению с мышами WT соответствующего возраста, тогда как у 5- и 12-месячных мышей было сравнимое количество. Число выживших BrdU-позитивных клеток, однако, значительно уменьшилось у 3-месячных мышей Tg2576, в то время как не было обнаружено никаких различий в более поздние моменты времени, что позволяет предположить, что нейрогенез изменяется уже в моменты времени, предшествующие значительному внеклеточному отложению амилоида [226].

В исследовании с использованием тройной трансгенной модели, экспрессирующей как мутантный APP, так и мутантный Тау на гомозиготном фоне нокдауна PSEN1 (3xTg) было показано, что у самок мышей 3xTg наблюдается значительное снижение нейрогенеза, начиная с возраста 4 месяцев по сравнению с контролем, что было напрямую связано с присутствием накопления интранейронального A β в CA1 области гиппокампа, в то время как внеклеточное отложение амилоида началось в 12 месяцев [334]. В другой модели с ранним дегенеративным и поведенческим фенотипом с экспрессией человеческого мутантного APP на фоне гомозиготного мутанта PSEN1 (APP / PS1KI) было зафиксировано значительное снижение числа митотических Ki67-иммунореактивных клеток в зубчатой извилине, сопровождаемое почти полным отсутствием DCX-позитивных клеток уже в возрасте 6 месяцев. Хотя количество Ki67- и DCX-позитивных клеток показало положительную корреляцию у контрольных животных PS1KI, у мышей APP / PS1KI такая корреляция не может быть установлена, что свидетельствует о том, что полная потеря DCX-позитивных клеток лишь частично отражает изменения в пролиферации мультипотентных клеток-предшественников [116]. Интересно, что стереологическое количественное определение нейронов гранулярного клеточного слоя в зубчатой извилине выявило значительное снижение количества гранулярных клеток у стареющих

(12-месячных) мышей APP / PS1KI по сравнению с контрольными животными PS1KI соответствующего возраста (-44%) [82]. Это может свидетельствовать о том, что дефектный нейрогенез действительно играет роль; однако сомнительно, что причиной такой драматической потери клеток в этом возрасте является лишь снижение нейрогенеза, поскольку известно, что нейрогенез в зубчатой извилине у грызунов в целом сильно снижается с возрастом.

1.2.3. Роль A β амилоида в нарушенном нейрогенезе

Большинство исследований предполагает, что накопление в гиппокампе A β пептидов в форме внеклеточных отложений оказывает сильное влияние на клетки-предшественники нервных клеток. Эта точка зрения может отражать наблюдение, что нарушение нейрогенеза в большинстве моделей становится очевидным только при значительном отложении амилоидных бляшек, в результате чего потенциальные патологические эффекты избыточной экспрессии APP в значительной степени игнорируются. Для более детального исследования роли A β была создана модель трансгенной мыши, которая экспрессирует человеческий мутантный APP избирательно в зрелых нейронах переднего мозга под контролем индуцибельной промоторной конструкции SAMKII α . Это позволяет различать эффекты, вызванные внеклеточным высвобождением фрагментов A β или APP, с одной стороны, и влиянием экспрессии APP человека в делящихся нейрональных клетках-предшественниках с другой [429]. В такой модели после активации гена обнаруживаются обширные амилоидные бляшки как в переднем мозге, так и в зубчатой извилине в возрасте 6 месяцев. Детальный анализ с использованием инъекций BrdU и последующего количественного определения через 7 или 30 дней для оценки недавно родившихся и выживания незрелых нейронов соответственно не выявил различий между трансгенными и контрольными мышами. Неизменная пролиферация и выживание взрослых нейронов

гиппокампа, несмотря на избыточную экспрессию APP в нейронах и близость амилоидных включений, позволяет предположить, что экспрессия APP в клетках нейральных предшественников может иметь решающее влияние [429]. В поддержку этой гипотезы свидетельствует гиперэкспрессия мутантного APP в гранулярных клетках зубчатой извилины у APP / PS1KI мышей уже в возрасте 2 месяцев или в нейросферах, выделенных от TgCRND8 трансгенных мышей [200].

В другом недавнем исследовании был рассмотрен вопрос о роли A β или APP за нарушение нейрогенеза. Авторы обнаружили нарушение нейрогенеза в зубчатой извилине мышей hAPP-I5, модели с гиперэкспрессией человеческого APP под контролем промотора PDGF- β . Это нарушение было более отчетливым, чем у мышей hAPP-J20 модели, в которой экспрессируется мутантный APP с мутациями Swedish и Indiana при сопоставимых уровнях мРНК и отмечается сильно повышенные уровни A β пептидов. Удаление цистатина C у мышей hAPP-J20 приводило к значительному снижению A β уровня, однако никакого влияния на число DCX-позитивных нейронов в зубчатой извилине не было обнаружено, что свидетельствует о том, что A β не является основным фактором, объясняющим нарушение нейрогенеза гиппокампа. в этой модели [302].

Хотя большинство доступных трансгенных моделей БА, по крайней мере в определенной степени, отражают основные патологические признаки болезни Альцгеймера, такие как обширное отложение внеклеточного пептида амилоида- β и нейровоспаление, нейродегенеративный фенотип с количественной утратой нейронов в большинстве случаев отсутствует [418]. В исследовании была описана обширная потеря нейронов в CA1 зоне гиппокампа у APP / PS1KI мышей, что привело к потере 30% нейронов уже в возрасте 6 месяцев по сравнению с контрольными мышами PS1KI и значительному уменьшению объема пирамидальной клеточный слой в CA1 зоне [57]. Эта потеря клеток тесно связана с накоплением A β белка. Анализы в других областях мозга, таких как, например, лобная кора, показали

сопоставимые результаты. Чтобы оценить возможность когнитивной стимуляции и усиленной физической активности влиять на поведение и потерю нейронов у APP / PS1KI трансгенных мышей содержали в условиях обогащенной среды или стандартных условиях, начиная с 2-месячного возраста. Удивительно, но не было обнаружено никаких положительных эффектов на рабочую память, образование внеклеточных бляшек A β , потерю нейронов, а также нейрогенез в гиппокампе [81].

Прямая связь между накоплением внутринейронального A β и последующей потерей нейронов в отдельных областях мозга была также установлена на мышинной модели, такой как TBA2.1 или Tg4–42,35, сконструированной для прямой гиперэкспрессии мутантных A β пептидов в отсутствие избыточной экспрессии мутантного APP. Эти модели используют нейрон-специфический Thy1-промотор для гиперэкспрессии различных видов A β амилоида –A β 3–42 или A β 4–42 и характеризуются обширной потерей нейронов CA1 и связанными с ней поведенческими нарушениями [266]. В модели Tg4–42 усиление физической активности с использованием обогащенной среды в клетках привело к уменьшению потери нейронов в CA1 зоне, сопровождающейся значительным увеличением общего числа клеток в гранулярном слое зубчатой извилины и сопутствующим увеличением числа DCX-позитивных клеток [183].

До сих пор ни в одной из исследованных моделей мышей не сообщалось о накоплении A β пептидов в нейронах зубчатой извилины. Тот факт, что многие из моделей, которые демонстрируют изменения в нейрогенезе, также экспрессируют значительные уровни мутантного APP в этой области мозга, что может сделать возможным такой механизм. В поддержку этой гипотезы была продемонстрирована секреция пептидов A β 40 и A β 42 в нервных клетках-предшественниках, выделенных от мышей TgCRND8, которые проявляют более высокую цитотоксичность по сравнению с контрольными клетками, полученными от нетрансгенных контрольных животных [200].

1.2.4. Олигомеры бета-амилоида – основная токсическая сопровождающая амилоидных заболеваний

Традиционно предполагалось, что именно зрелые фибриллы амилоида и бляшки ответственны за токсичность, связанную с амилоидными заболеваниями [42]. В результате большинство исследований были (и остаются) в первую очередь направлены на разработку методов лечения, которые либо предотвращают образование или вызывают деградацию фибрилл, а также в целом снижают амилоидные депозиты. Тем не менее, лечение, направленное на снижение отложения амилоида при болезни Альцгеймера, провалилось на разных этапах клинических испытаний и в целом неэффективно при лечении людей с клиническими симптомами [141]. Это, наряду с растущими доказательствами того, что растворимые олигомеры являются основным источником токсичности не только при болезни Альцгеймера, но и при ряде других амилоидных заболеваний [118], привело к смещению акцента на попытки понять и объяснить олигомерную токсичность. Кроме того, именно наличие и количество токсичных олигомеров коррелирует с симптомами у пациентов с болезнью Альцгеймера, а не с отложением амилоидных бляшек [242].

Логично предположить, что способность разрабатывать эффективные методы лечения для борьбы с токсичностью, связанной с олигомерами, тесно связана со способностью определить структуру этих олигомеров. К сожалению, однако, это оказалось невозможным из-за временной, гетерогенной и динамической природы этих олигомеров. Поскольку олигомеры существуют в динамическом равновесии, олигомеры могут легко диссоциировать на мономеры, принимать различные олигомерные состояния или легко агрегировать в фибриллы, что затрудняет выделение и поддержание «чистых» видов олигомеров. Таким образом, методы, которые традиционно используются для характеристики структуры белка, такие как рентгеновская

кристаллография или ЯМР белка, имеют ограниченное применение. Это стало основным препятствием на пути прогресса в понимании олигомерных комплексов при амилоидных отложениях и, следовательно, в разработке эффективных методов лечения амилоидных заболеваний [22].

Олигомеры А β могут быть внеклеточными *in vivo*, существующими в спинномозговой [354] и в интерстициальной жидкости [384]. Некоторые клетки мозга при экспериментальном воздействии внеклеточных олигомеров А β становятся дисфункциональными и разрушаются. Однако, какие патологические процессы вызывают олигомеры А β до сих пор остается малоизученным [79, 377].

Самая простое объяснение состоит в том, что повреждение клеток инициируется физико-химическими взаимодействиями между олигомерами А β и нейрональными мембранами. Сообщалось, что олигомеры А β могут вставляться непосредственно в липидный бислой, вызывая ее разрушение. Недавно было рассмотрено возможное участие металлов в механизме [410]. Некоторые эксперименты показывают, что олигомеры А β обладают большей аффинностью к мембране, чем мономеры [347]. Олигомеры А β , модифицированные пироглутаматом, также связывают нейроны и вызывают потерю целостности плазматической мембраны [154]. Образование ионных каналов в клеточных мембранах [49] было описано для олигомеров А β 42, но не для А β 40. Сообщается, что отдельные А β , более крупные, чем тримеры, вызывают проникновение Ca⁺⁺, когда они пересекают клеточную мембрану [356].

Одна существенная трудность, с которой сталкивается гипотеза вставки олигомеров в бислой, заключается в ее неспособности объяснить специфичность прикрепления А β олигомеров. Два нейрона, расположенные рядом друг с другом могут демонстрировать совершенно различную способность накапливать олигомеры А β , так один демонстрирует сильное синаптическое накопление, а в другом практически не обнаруживается [232]. Клеточно-специфическая токсичность, измеренная по

гиперфосфорилированию тау-белка, коррелирует с этим связыванием. Существует также сложность в учете насыщающей способности связывания, хотя можно утверждать, что вставка олигомеров A β в липидные рафты, специфичные для конкретных синапсов, может быть насыщаемой. Было выдвинуто предположение, что олигомеры A β могут действовать через липиды и белки, образуя поры в мембранах, а также связываясь с рецепторами, вызывая специфические внутриклеточные ответы [189].

Рецепторная гипотеза рассматривает A β олигомеры как патогенные лиганды, которые случайным образом связываются со специфическими белками, действующими в качестве рецепторов токсина. В соответствии с данной гипотезой, связывание A β олигомеров показывает (1) насыщение и высокое сродство к культивируемым нейронам и препаратам синапсом; (2) специфичность для определенных нейронов и определенных областей мозга; (3) нацеленность на синапсы; (4) накопление в дендритных шипиках; (5) патологическое воздействие, такое как гиперфосфорилирование тау-белка, специфичное для нейронов, связанных с олигомерами; (6) чувствительность к низким дозам антагониста; (7) связывание с трипсин-чувствительными белками; (8) ассоциация с небольшими участками изолируемых мембран; и (9) специфичность в вестерн-иммуноблотах. Эти данные в основном применимы к полученным из мозга и синтетическим олигомерам и подтверждают гипотезу о том, что связывание олигомеров является лигандоподобным и случайным образом опосредуется белками, действующими в качестве рецепторов токсина [79].

При болезни Альцгеймера наряду со специфическими нейропатологическими особенностями, отложениями амилоида в головном мозге и нейрофибрилярными клубками реактивный глиоз свидетельствует об участии воспаления в патологическом процессе [169]. Тем не менее, потеря синапсов является структурным изменением, которое наилучшим образом коррелирует с когнитивной дисфункцией у пациентов с БА. Нейрональная дисфункция, индуцированная растворимыми олигомерами может объяснить

положительную корреляцию церебрального A β с клиническими проявлениями [119].

Согласно последней версии гипотезы амилоидного каскада [354], патологический сценарий болезни Альцгеймера идентифицирует растворимые небольшие агрегаты A β , A β олигомеры, как основные компоненты, ответственные за нейронную дисфункцию [413]. Совсем недавно был введен термин олигомеропатия, чтобы проиллюстрировать тесную связь между нейродегенерацией и этими гетерогенными образованиями растворимых агрегатов [295]. Механизм распространения заболевания, описанный в моделях БА, может использовать олигомеры в качестве молекул, ответственных за межклеточную передачу [355]. Хотя некоторые аспекты этого механизма все еще неясны, межклеточный пассаж может использовать небольшие агрегаты для распространения патологии [261]. Таким образом, олигомерные структуры могут играть центральную роль как для нейрональной дисфункции, так и для распространения заболевания [90].

Роль олигомеров бета-амилоида представлена на рисунке 7 (Рисунок 7).

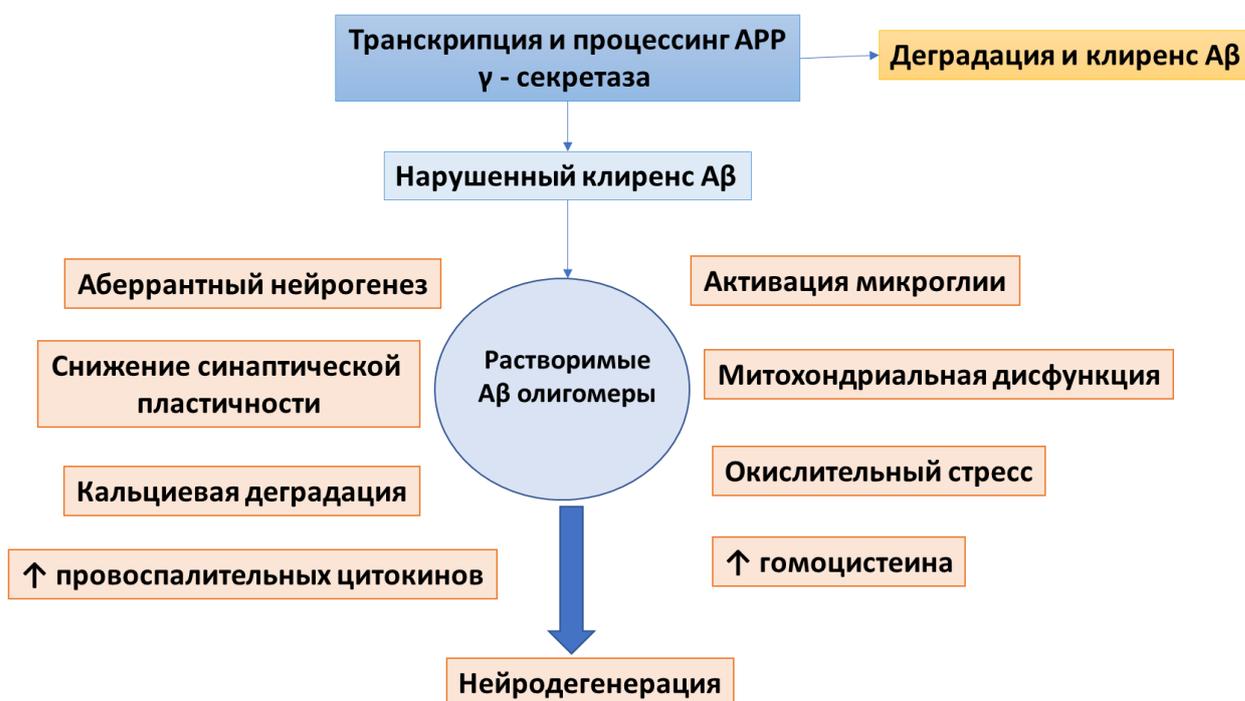


Рисунок 7 – Роль олигомеров бета-амилоида. Оригинальный рисунок, составленный по данным литературы.

1.3. Нейровоспаление и нейродегенерация

Общей чертой нейродегенеративных расстройств, в частности болезни Альцгеймера, является хроническое нейровоспаление и/или активация микроглии и астроглии, которые, вероятно, влияют на нейрогенез взрослых и способствуют развитию болезни [1]. Первоначально рассматриваемый как эпифеномен в нейродегенеративном процессе, нейровоспаление все чаще реализуется как неотъемлемый компонент многих нейродегенеративных заболеваний [2, 5, 8]. Существует много потенциальных факторов, способствующих хроническому нейровоспалительному состоянию при БА, а доминирующая гипотеза заключается в том, что образуется порочный круг между глиальной активацией и гибелью нейронов, то есть связанные с опасностью молекулярные структуры DAMPs, выпущенные из вырожденных нейронов, активируют глиальные клетки через toll-подобные рецепторы (TLR), и нейровоспаление оказывает дальнейшее содействие прогрессированию нейродегенерации [111]. Активация данных рецепторов приводит к сборке так называемого цитозольного мультипротеинового комплекса - инфламмосомы NLRP3 [17, 359]. Ранее исследования свидетельствовали о том, что активация воспаления NLRP3 посредством DAMPs играет центральную роль в воспалении, вызванном ожирением, инсулинорезистентностью, сахарным диабетом 2 типа, а также при нейродегенеративных заболеваниях [240].

Таким образом, растущие данные свидетельствуют о том, что нейровоспаление влияет на взрослый нейрогенез, что способствует патогенезу многочисленных нейродеструктивных, нейропсихиатрических и неврологических расстройств. Однако многие вопросы остаются без внимания. Например, проще говоря, в воспаленном мозге разнообразный спектр воспалительных молекул сосуществует и потенциально взаимодействует, а сходящийся эффект от нейрогенеза может отличаться от

сходимости отдельных цитокинов. Кроме того, такой эффект может существенно различаться при когнитивной стимуляции головного мозга. Изучение механизмов того, как нейровоспаление регулирует нейрогенез в контексте различных заболеваний, а также моделирование нейрогенеза путем нацеливания на нейровоспаление может обеспечить новую терапевтическую стратегию для этих нарушений мозга.

1.3.1. Роль глиальных клеток нейрогенных ниш в опосредовании нейровоспаления при нейродегенерации

Бета-амилоид в мозговой среде вызывают активацию микроглии и астроцитов, что приводит к микроглиозу и астроцитозу вокруг патологических структур [342]. Таким образом, глиальные клетки хронически активируются в головном мозге до начала БА, что ассоциировано с развитием хронического воспаления, способствующим патогенезу БА. В мозге БА микроглиоз и астроцитоз как следствие присутствия сенильных бляшек и NFT могут быть обнаружены иммуногистохимически, причем эти глиальные клетки демонстрируют патологически-специфическую морфологию. Хотя степень глиоза коррелирует с толщиной коры и нейродегенерацией, роль различных глиальных клеток в нейродегенеративных процессах остается неясной [342].

Микроглия, основные иммунные клетки врожденного иммунитета головного мозга, выполняют макрофагоподобные фагоцитарные действия для удаления патогенов и защиты нейронов от различных факторов. Однако микроглия продуцирует и высвобождает молекулы, такие как активные формы кислорода и оксид азота, которые являются нейротоксичными. Они также генерируют провоспалительные цитокины и хемокины в ответ на сигналы опасности и связываются с астроцитами. Дисрегуляция активности микроглии связана с патогенезом БА при старении [78]. Недавно было сообщено, что TREM2, а также CD36 и рецептор для конечных продуктов с высоким уровнем

гликирования (RAGE), действуют как сенсорные молекулы A β и активируют микроглию. Активированная микроглия также продуцирует провоспалительные цитокины CCL3 / MIP-1 α и интерлейкин IL-6, причем последний является ключевым компонентом, связанным с секреторным фенотипом, который может обеспечить патофизиологическую связь между клеточным/тканевым старением и возрастными хроническими заболеваниями в головном мозге, включая БА. Кроме того, провоспалительные генные полиморфизмы, включая CCL3 / MIP-1 α и IL-6, были определены как факторы риска для БА [449].

Генетическая модуляция факторов, связанных с воспалением, была исследована в различных трансгенных моделях БА. Эти исследования показали, что модуляция воспалительных факторов изменяет амилоидную патологию и фосфорилирование тау в используемых моделях мышей. Интересно, что очаг воспаления, ключевая воспалительная сигнальная платформа в иммунных клетках, которая активирует IL-1 β и IL-18 посредством активации NLRP3 / ASC / Caspase1, в микроглии, может способствовать патогенезу БА у APP/PS1 мышей [253]. С этой целью было показано, что ASC, происходящие из микроглии (составляющая воспалительного вещества), регулируют амилоидоз у мышей APP^{swe} / PSEN1^{dE9.35}. Также была исследована модуляция глиальной функции посредством изменения уровня цитокинов / хемокинов и их рецепторов. Эти результаты подтверждают мнение, что реактивное нейрогенное воспаление ускоряет патогенез БА, особенно связывая патологию тау с нейродегенерацией [342].

Астроциты выполняют множество функций, включая поддержку эндотелиальных клеток, которые формируют нейроваскулярные единицы в гематоэнцефалическом барьере, поставку питательных веществ в центральную нервную систему, поддержание внеклеточного баланса электролитов и воды, а также восстановление или ремоделирование тканей во время травматического поражения головного мозга или при нейровоспалении.

Реактивные астроциты обычно можно наблюдать вблизи амилоидной бляшки (астроциты, связанные с бляшками). Хотя основная функция астроцитарного ответа, связанного с бляшками, остается неясной, делеция глиальных филаментных белков, белка глиальной фибриллярной кислоты и виментина у мышей APP / PS1 увеличивала количество дистрофических нейритов, тогда как астроцит-продуцирующая калликреин-связанная пептидаза способствовал деградации A β [209, 331]. Астроциты также способствуют выведению A β и других патологических включений из мозга посредством астроцитарного транспорта, так называемой "глимфатической системы" [41]. Поскольку глимфатическая система сравнима с лимфатической системой в периферических органах, астроциты могут действовать как ворота из ткани головного мозга к кровеносным сосудам. Недавно было сообщено, что фагоцитарные астроциты наблюдались в ишемических участках головного мозга [277]. Предполагалось, что астроцитарный фагоцитоз охватывает и разрушает связанные с бляшками синаптические дистрофии у мышей APP / PS-1 в головном мозге при БА [142]. Хотя требуется дальнейшая классификация типов астроцитов, ассоциированные с амилоидными бляшками реактивные астроциты могут защищать нейроны, окружающие амилоидные бляшки на ранних стадиях патогенеза БА. В то время как эти глиальные клетки, таким образом, служат «стражами» микроокружения головного мозга, любое нарушение регуляции глиальной коммуникации может привести к нейротоксическому состоянию [342].

Регуляция глиального ответа может заметно измениться в зависимости от патологической стадии процесса. Однако до сих пор неясно, какие глиальные клетки, астроциты или микроглия распознают аномальные белковые агрегаты как сигналы опасности и как это достигается, особенно учитывая, что связь между астроцитами и микроглией регулируется патологически ассоциированными цитокинами / хемокинами [342].

Следует отметить, что последние данные позитронно-эмиссионной томографии на людях (A β -PET) показывают, что отложение A β начинается за

годы, если не за десятилетия до нарушения памяти и снижения когнитивных способностей [162]. Учитывая тот факт, что А β действует как сильный DAMP (связанные с опасностью молекулярные паттерны), представляется вероятным, что на интервал между ранним накоплением А β и более поздними признаками прогрессирования заболевания, такими как тау-патология и атрофия головного мозга, влияют, если не стимулируются, врожденные иммунные ответы. Что касается такой важной роли врожденной иммунной системы, следует учитывать, что А β может представлять собой только начальный, но не исключительный иммунный стимул в мозге при БА. В случае гибели нейронов, дериваты клеток будут накапливаться, и эти клеточные массы обычно являются даже более сильным иммуноиндуцирующим DAMP. Ярким примером медиаторов, которые следуют за первым этапом активации, является накопление хромогранина А, радикальных форм кислорода и других воспалительных факторов, таких как MRP14, факторы комплемента и цитокины, которые могут поддерживать или даже стимулировать воспалительную реакцию в мозге [396].

Одним из канонических путей этого врожденного иммунного ответа, вызванного А β , является активация семейства NOD-подобных рецепторов (NLR), пиринового домена, содержащего 3 (NLRP3) воспаления, которое стало предметом интенсивных исследований [171].

Врожденный иммунный ответ участвует в различных воспалительных процессах и играет особенно важную роль в начальной и конечной фазах бактериальных и вирусных инфекций. Белки, экспрессируемые клетками врожденной иммунной системы, рецепторы распознавания патогенов (PRR), реагируют на инфекционные агенты. PRR экспрессируются различными клетками такими как макрофаги, моноциты, дендритные клетки и эпителиальные клетки и, как правило, во всех клетках адаптивного иммунного ответа. PRR включают мембранные рецепторы – Toll-подобные рецепторы (TLR) и лектины С-типа (CTL), которые контролируют присутствие патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs), внеклеточные и

эндосомные компартменты и связанные с опасностью молекулярные паттерны (DAMP) [396].

Активация PRRs с помощью PAMP и DAMP запускает передачу сигнала, которая часто включает в себя активацию фактора транскрипции NF- κ B и белок-1 активатор, который стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов. Активация воспаления является ключевой функцией, опосредованной иммунной системой. Некоторые рецепторы распознавания патогенов являются важными компонентами инфламмосомного комплекса, в том числе Nod-подобных рецепторов ((NLR) [120] и индуцируемый интерфероном белок. Когда стимулируется PAMPs и DAMPs, NLR или AIM2 образует белковый комплекс с прокаспазой-1 и с или без помощи адаптерной молекулы, такой как апоптоз-связанный спек-каспазный рекрут домен (ASC). Образованный таким образом комплекс называется инфламмосомой. Первая инфламмосома была представлена Tschopp и соавт., которые описали ее как мультипротеиновый комплекс, локализованный в цитоплазме, приводящий к запуску продукции провоспалительных цитокинов, такие как IL1b и IL18 для вовлечения в иммунную защиту [352].

В последнее время большое количество сведений указывает на существование инфламмосома-опосредованных патологических путей при заболеваниях ЦНС. В частности, семейство NLR содержащий пирин-домен-3 (NLRP3) инфламмосом играет патогенетическую роль при некоторых нейровоспалительных заболеваниях, таких как депрессия, БА и болезнь Паркинсона [360].

Так было показано *in vitro*, что отложение A β пептидов способно активировать инфламмосомы. При исследовании роли NLRP3 *in vivo* у мышей с БА было продемонстрировано, что мыши, нокаутированные по гену *Nlrp3*, были защищены от ухудшения пространственной памяти и у них наблюдалось снижение отложения A β бляшек [171].

1.3.2. NLRP3: структура, активация и регулирование

Семейство белков NLR, участвующих в врожденном иммунном ответе индуцирует сборку большого каспазы-1-активирующего мультипротеинового комплекса, называемого инфламмасомы. Активация каспазы-1 через аутопротеолитическое созревание приводит к секреции провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18. В настоящий момент идентифицированы различные NLR-инфламмасомы: NLRP1 / NALP1b- инфламмасомы; NLRC4 / IPAF-инфламмасомы [448]; NLRP3 / NALP3 инфламмасомы; и AIM2-содержащая инфламмасомы. Эти комплексы включают специфический белок NLR или AIM2, ASC и / или адаптерные белки и прокаспазу-1. Впервые NLRP3-инфламмасомы были описаны Hoffman [177]. Позднее была продемонстрирована способность NLRP3 инфламмасомы действовать на про-IL-1 β . NLRP3 инфламмасомы являются наиболее изученным и полностью охарактеризованным типом молекул; состоят из NLR, молекулы-адаптера ASC и эффекторной молекулы прокаспазы-1. Активация каспазы-1 приводит к продукции и секреции провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18, которые вызывают различные биологические эффекты, связанные с инфекцией, воспалением и аутоиммунными процессами. Созревание IL-1 β и IL-18 расщеплением каспазы-1 является необходимым условием для индукции иммунной защиты [170].

В настоящее время общепризнано, что активация и высвобождение IL-1 β требует двух разных сигналов. Природа этих сигналов *in vivo* во время инфекции или воспаления остается не полностью исследованной и спорной. Исследования *in vitro* показывают, что первый сигнал запускается TLR активацией и приводит к синтезу про-IL-1 β и других белков, необходимых для инфламмасом. Вторым сигналом, необходимым для секреции IL-1 β обеспечивается активацией инфламмасомы и каспазы-1. В общем, формирование и сборка инфламмасом требует нескольких шагов. Начальный

этап приводит к активации фактора транскрипции NF-κB. Активация NF-κB критически важна для активации транскрипции как proIL-1β, так и самой NLRP3. На этом этапе NLRP3 находится в сигнально-некомпетентной конформации и базальные уровни NLRP3 неадекватны для эффективного образования инфламмасом. Второй сигнал, обеспечиваемый различными агонистами, способствует косвенной активации воспаления с помощью ионов, ROS или АТФ. Транскрипционная модуляция не требуется ASC и прокаспазе-1 [427].

Экспрессия и активация NLRP3-инфламмасом in vivo

Инъекция Aβ в мышинный стриатум, область мозга, принадлежащая базальным ганглиям, приводила к увеличению микроглии F4 / 80 и активации макрофагов [157]. Интересно, что рекрутирование миелоидных клеток было заблокировано у животных с дефицитом ASC и каспазы-1 нокаутных животных. Аналогично, генетические рецепторы IL-1 или мыши с дефицитом MyD88 не продемонстрировали существенной иммунной реакции в этой экспериментальной парадигме, предполагая, что острая активация воспалительной миелоидной реакции с помощью Aβ требует многошагового сигнального события, это включает в себя MyD88, а также сборку NLRP3 воспаления [385].

В экспериментальном подходе с использованием трансгенных моделей БА, *Nlrp3* нокаутных животных скрещивали с трансгенными APP / PS1 животными и анализировали нейропатологические изменения, поведенческие симптомы и функцию микроглии в неокортексе и в гиппокампе [170]. У стареющих трансгенных мышей APP / PS1 обнаружен провоспалительный фенотип, который характеризуется иммуноактивированными микроглиальными клетками, что свидетельствует о ретракции процесса и увеличении объема самих клеток и их отростков. В головном мозге этих мышей были обнаружены более высокие уровни провоспалительных медиаторов. При гистологическом исследовании было выявлено, что микроглиальные клетки окружают бляшки Aβ без каких-либо признаков

фагоцитарного поглощения и, таким образом, оказываются скорее парализованными, чем фагоцитарно активными. В отличие от животных APP / PS1dE9, которые были генетически дефицитными по гену *Nlrp3*, макрофаги распространяли свои отростки к отложениям A β . Было выявлено двукратное увеличение способности к фагоцитарному клиренсу в количественном анализе *in vivo* [167].

Аналогично, у нокаутных животных APP / PS1xNLRP3 наблюдалось двукратное увеличение экспрессии инсулин-деградирующего фермента (IDE). Это представляет особый интерес, так как IDE является одним из немногих ферментов, который способен расщеплять внеклеточный A β . Наблюдаемое увеличение может иметь функциональную значимость, поскольку ранее было продемонстрировано, что увеличение IDE сильно ограничивает накопление церебрального A β у APP трансгенных мышей. Комбинированный эффект от увеличения продукции IDE и фагоцитарного клиренса A β значительно приводил к снижению накопления A β даже в позднем возрасте. Так как иммуногистохимия обнаружила, что NLRP3 экспрессируется исключительно в клетках микроглии, пришли к выводу, что наблюдаемые изменения были полностью обусловлены модуляцией NLRP3 воспаления в этих клетках. Более важным, чем удаление A β , было открытие того, что врожденное иммунное ингибирование защитит от индуцированной APP / PS1 потери синапсов в апикальных кортикальных нейронах. Животные, нокаутированные по генам NLRP3- и каспаза-1, показали полную защиту в трансгенной модели APP / PS1. В то же время, анализ долгосрочной потенциации гиппокампа (LTP), электрофизиологической меры формирования и консолидации памяти, показала заметное снижение у мышей APP / PS1. Нокаут гена *Nlrp3* полностью нормализовал LTP, предполагая, что врожденные иммунные факторы, активируемые после активации NLRP3 сигнального пути, ответственны за подавление LTP вместо самого A β . Одним из возможных NLRP3-зависимых факторов здесь является сам IL-1 β , поскольку подавление LTP интерлейкином IL-1 β ранее было показано на срезах гиппокампа мышей дикого типа.

Генетический нокаут *Nlrp3* полностью предотвращает продукцию IL-1 β . Функциональная защита, однако, не ограничивалась физиологией срезов: тестирование мышей в пожилом возрасте показало, что нокаут *Nlrp3*- и каспазы-1 может предотвратить потерю гиппокампальной памяти, а именно пространственной навигационной памяти, а также распознавание объектов [170].

Активаторами инфламмасом являются как экзогенные, так и эндогенные молекулы, такие как кристаллические молекулы, АТФ, липополисахарид (LPS) и пептидогликан. АТФ через свой рецептор клеточной поверхности P2X7R, молекулы, полученные из лизосом и порообразующие токсины вызывают активацию NLRP3 инфламмасом. Недавние результаты показали, что NLRP3-инфламмосомы активируются в микроглии бета-амилоидом, вызывая нейровоспаление [203].

1.3.3. Формирование NLRP3 инфламмасом при нейродегенерации

Инфламмосомы экспрессируются в ЦНС, в частности NLRP1-инфламмосомы в нейронах, NLRP2- инфламмосомы в астроцитах, NLRP3 инфламмосомы в микроглии и AIM2- инфламмосомы в нейронах [18]. Инфламмосомы в ЦНС участвуют в генерации врожденного иммунного воспалительного ответа через высвобождение цитокинов IL-1 глиальными клетками. Глиальные клетки в ЦНС включают астроциты, олигодендроциты и микроглию [171].

Астроциты обеспечивают связь между сосудистой системой и нейронами, транспортируя вещества из кровотока. Микроглия представляет собой иммунные эффекторные клетки ЦНС, которые в большом количестве присутствуют в паренхиме головного мозга. Согласно данным литературы увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов микроглией и

астроцитами в мозге приводит к нейровоспалению с последующей нейродегенерацией [399].

Микроглия представляет собой резидентные макрофаги ЦНС. Они экспрессируют многочисленные рецепторы врожденной иммунной системы, включая TLR, NLR, рецепторы CTL, и индуцируемые ретиноевой кислотой ген-I-подобные рецепторы [178]. Последние результаты продемонстрировали NLR-опосредованную активацию микроглии при нейродегенерации [171] и инфекционных заболеваниях мозга [383]. Опосредованная инфламмасомами активация микроглии участвует как в инфекционных, так и неинфекционных неврологических заболеваниях. Некоторые компоненты инфламмасом, включая NALP3, NALP1, ASC и каспазу-1, экспрессируются микроглией. Кроме того, в ответ на проникновение патогенов или реакцию на клеточные стрессоры (агрегаты патологического белка, АТФ и активные формы кислорода) происходит гиперпродукция провоспалительных цитокинов клетками микроглии. Увеличение количества микроглии и астроцитов также связано с нейродегенеративными заболеваниями [367].

Как известно БА является наиболее распространенной формой деменции, нейродегенеративным заболеванием головного мозга, приводящим к прогрессирующей потере памяти. Распространенность БА различается в зависимости от нескольких факторов, включая возраст, сопутствующие заболевания, генетику и уровень образования. Основные патологические признаки БА характеризуются повреждением энторинальной коры, гиппокампа, миндалина, приводя к ухудшению памяти, временной и пространственной дезориентации и изменению когнитивных функций в мозге. Микроглия может оказывать нейротоксический или нейропротекторный эффект [299]. Микроглия, активированная ЛПС, интерфероном- γ или ФНО считается M1 (классически активированной) формой микроглии [196]. Активация M1 микроглии жизненно необходима для защиты от патогенов при продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , TNF- α , STAT3, IL-6, IL-12, IL-23, и свободных радикалов. С другой стороны, альтернативный M2

(противовоспалительный) фенотип способствует восстановлению тканей и ангиогенезу посредством высвобождения противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4, IL-10, IL-13 и трансформирующего роста фактор- β и низкого уровня провоспалительных цитокинов [86]. Недавно в исследовании было продемонстрировано, что есть ингибирование NLRP3 может индуцировать микроглиальный фагоцитоз и формирование M2 фенотипа микроглии [170].

Известно, что в головном мозге клетки микроглии активируются и образуют тесные связи с амилоидными отложениями, распространяя свои отростки в ядро бляшки [217]. Микроглия в состоянии распознавать и усиливать иммунный ответ на A β пептиды, а также мигрировать в области отложения амилоида; однако, несмотря на их способность взаимодействовать с этими включениями, они не способны очистить мозг от амилоидных бляшек. Отложение амилоида в паренхиме мозга связано с сильным воспалительным ответом. Амилоидные бляшки и секреция цитокинов активированной микроглией способствуют нейродегенеративному повреждению, лежащему в основе патогенеза БА. Микроглиальные клетки фагоцитируют патогены и токсины, но они также могут быть активированы для продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов и нейротоксинов [22].

Недавно исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что A β активирует NLRP3 инфламмосомы в микроглиальных клетках, описывая новый путь, который может привести к прогрессированию БА. Бета-амилоид A β и NFT высвобождают DAMP, которые распознаются доменом NLR на глиальных клетках. Активация NLRP3 приводит к сборке инфламмосом, которые инициируют каскад событий, ведущих к созреванию и освобождению про-IL-1 β , IL-18. Кроме того, взаимодействие A β с мембраной нейронов вызывает отток ионов калия и активирует инфламмосомы, которые, в свою очередь, способствуют секреции цитокинов [348].

Активация пуриnergического рецептора P2X7 снижает внутриклеточные уровни калия. Нарушение активности Na⁺/K⁺-АТФазы уменьшает градиенты ионов через клеточную мембрану, вызывая

цитотоксичность и приводя к гибели нейронов. Гибель нейронов активирует NLRP3 инфламмосомы [108]. Исследования *in vivo* и *in vitro* продемонстрировали прямую связь между активностью воспаления и патогенезом БА, предполагая, что инфламмосомы являются потенциальной терапевтической мишенью для лечения БА [170].

Логично предположить, что механизмы влияния формирования NLRP3 инфламмосом могут различным образом влиять на прогрессирование нейровоспаления при хронической нейродегенерации, в том числе за счет влияния на нейрогенез [454].

1.3.4. CD38 и CD157: глиальный контроль нейровоспаления при нейродегенерации

На роль молекул, играющих роль в развитии нейровоспаления при нейродегенерации, могут претендовать молекулы CD38 и CD157. CD38 и CD157 – ферменты с НАД⁺гликогидролазной активностью, которые утилизируют никотинадениндинуклеотид (НАД⁺) в качестве субстрата и способствуют образованию вторичного посредника – циклической аденозиндифосфорибозы (цАДФ-рибозы) [337].

CD38 экспрессируется в различных тканях и клетках. Среди них - образованные из кроветворных клеток моноциты, дендритные клетки, лимфоциты и микроглия, а также астроциты и некоторые типы нейронов [289]. Субстратным лигандом CD38 является НАД⁺, а несубстратным – CD31. Ранее было показано, что CD38 регулирует микроглиальный ответ при развитии нейровоспаления. Это способствует активации микроглии и индуцированной гибели клеток и регулирует ответ микроглии [263]. Образование в клетках микроглии цАДФ-рибозы способствует мобилизации кальция из внутриклеточных депо, активации клеток и реализации их цитотоксического потенциала. С другой стороны, эти же события могут приводить к

уменьшению уровня НАД⁺ в клетках и тормозить работу НАД⁺-зависимых или НАД⁺-утилизирующих процессов. Кроме того, CD38 экспрессируется нейронами, определяя их ответ на ряд нейротрансмиттеров, и астроцитами, предположительно участвуя в активации и миграции клеток [163].

Преимущественно CD38 экспрессируется на клеточной мембране, но вместе с тем была обнаружена и внутриклеточная локализация фермента в цитоплазме, ядре и митохондриях. Это дало право предполагать участие CD38 в регуляции гомеостаза НАД⁺ в клетках, что нашло подтверждение в работе, в которой было показано, что мыши, дефицитные по CD38 демонстрируют увеличение уровня НАД⁺ во многих тканях, в том числе и в головном мозге [175]. В контексте нейровоспаления это особенно интересно, с учетом того, что экспрессия CD38 регулируется провоспалительными цитокинами [60].

Ранее было показано, что мыши с делецией гена *Cd38* имеют следующие поведенческие проявления: нарушение социальной памяти, социальных взаимодействия и материнского поведения. CD38 описывается как ген-кандидат расстройств аутистического спектра (ASD), и его поведенческие фенотипы могут быть связаны с ASD. В исследовании с использованием нокаутных мышей не было обнаружено различий по толщине кортикального слоя. Тем не менее зафиксированы и отклонения в количестве нейронов и их морфологии в зрительной коре и зубчатой извилине гиппокампа. В частности, были выявлены различия между развитием синапсов у мышей CD38^{-/-} и CD38^{+/+} в апикальных дендритах зрительной коры и пирамидных нейронах CA1 зоны гиппокампа. Полученные данные свидетельствуют о том, что CD38 участвует в соответствующем развитии областей мозга, важных для социального поведения [289].

Еще в одном исследовании упоминается, что делеция *Cd38* приводит к нарушению развития астроцитов и олигодендроцитов у мышей. Пик экспрессии CD38 в развивающемся мозге наблюдается между постнатальным днем 14 (P14) и днем 28 (P28). Исследования показали, что CD38 экспрессируется преимущественно в астроцитах в эти периоды. Анализы коры

мышей с нокаутом Cd38 (Cd38 - / -) выявил задержку развития астроцитов и, как следствие, задержку дифференцировки олигодендроцитов на постнатальных стадиях. Эксперименты *in vitro* с использованием первичных культур олигодендроцитов, смешанных глиальных культур и астроцитарной кондиционированной среды показали, что CD38 регулирует развитие астроцитов клеточно-автономным способом и дифференцировку олигодендроцитов не клеточно-автономным образом. Дальнейшие эксперименты показали, что коннексин43 (Cx43) в астроцитах играет стимулирующую роль для CD38-опосредованной дифференцировки олигодендроцитов. Наконец, повышенные уровни NAD⁺, вызванные дефицитом CD38, вероятно, ответственны за подавление астроцитарной экспрессии Cx43 и дифференцировку олигодендроцитов. Таким образом, данные показывают, что CD38 является положительным регулятором развития астроцитов [163]. Следовательно, данная молекула может рассматриваться одним из возможных регуляторов формирования микроокружения в головном мозге.

CD157 принадлежит к тому же семейству ферментов, что CD38 и участвует в продукции цАДФР. В иммунных клетках CD157 отвечает за перегруппировку белков цитоскелета, связанную с активацией клеток и миграцией и может образовывать функциональный комплекс с CD11b/ CD18, таким образом, способствуя клеточной адгезии [201]. Данные об его экспрессии ограничены. Ранее было установлено, что CD157 экспрессируются миелоидными клетками, а также синовиальными, эндотелиальными и фолликулярными дендритными клетками. Более того, CD157 присутствуют на других типах клеток и тканей, таких как фибробласты, тучные клетки легких, в матке, перитонеальных мезотелиальных клетках и других. Меньше известно об особенностях экспрессии CD157 в головном мозге, но именно эта молекула рассматривается в качестве одного из участников патогенеза нейродегенерации при болезни Паркинсона [201].

В недавнем исследовании мыши, нокаутированные по CD157 / BST1 (CD157 KO), демонстрировали поведение, подобное наблюдаемому при депрессии в тесте принудительного плавания и тесте подвешивания за хвост, а также тревожное поведение, в тесте открытого поля, светло-темной камере и приподнятом крестообразном лабиринте. Кроме того, у этих мышей наблюдали нарушение социального поведения в тесте социального предпочтения, которые частично напоминают психиатрические симптомы, наблюдаемые у пациентов с болезнью Паркинсона. Тем не менее у мышей CD157 KO не было выявлено дегенерации nigростриатальных дофаминергических нейронов, какой-либо явной двигательной дисфункции или какого-либо изменения чувствительности к дофаминергическим нейронам по отношению к 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридину [256]. Кроме того, нельзя исключить возможность того, что поведенческие фенотипы у мышей CD157 KO связаны с расстройством аутистического спектра [201].

Нейрогенез, определяющий во взрослом мозге эффективность восстановления после повреждения, а также необходимый для реализации когнитивных функций и запоминания, является процессом, протекающим в специализированных зонах головного мозга – нейрогенных нишах, в которых формируется микроокружение, способствующее пролиферации и дифференцировке клеток [223]. Вполне вероятно, что поддержание уровня НАД⁺ в микроокружении стволовых и прогениторных клетках головного мозга является одним из механизмов регуляции их нейрогенной активности.

1.3.5. Рецепторы конечных продуктов гликирования белков RAGE и их роль в развитии нейродегенерации

В последние годы появились исследования изучения участия рецепторов конечных продуктов гликирования белков Receptor For Advanced Glycation

End Products, RAGE) участие в развитии болезни Альцгеймера. Ассоциация рецептора конечных продуктов гликирования белков (RAGE) с БА возникла из исследования по скринингу генов, показавшего, что RAGE может связываться с А β в схожей манере как он связывается с конечными продуктами гликирования модифицированных белков и лигандов (AGE). Образование AGE-модифицированных белков или липидов происходит в результате неферментативного добавления глюкозы (гликирование). Этот процесс происходит в присутствии высоких концентраций свободной глюкозы, что характерно для пациентов с сахарным диабетом. Хотя повышенные уровни AGE-модифицированных белков были обнаружены в мозге при БА [378], именно взаимодействие с А β считается более значимым и находилось в центре внимания большинства последующих исследований. RAGE были идентифицированы и клонированы из легочной ткани, и было показано, что она связывается с AGE-модифицированными лигандами, которые распространены у пациентов с диабетом. Активация RAGE белками, модифицированными AGE, считается основной причиной сосудистой патологии, которая встречается у пациентов с диабетом. RAGE экспрессируется многими различными типами клеток, включая нейроны, эндотелиальные клетки мозга, астроциты и микроглию. Белок RAGE состоит из трех иммуноглобулиноподобных доменов; домен V-типа, участвующий в связывании лиганда, и два домена C-типа; один короткий трансмембранный домен и цитоплазматический хвост, который участвует во внутриклеточной передаче сигналов. Следствием взаимодействия лигандов RAGE была индукция клеточной передачи сигналов, что привело к усилению окислительного стресса и усилению транскрипции провоспалительных генов [239]. Биологические особенности RAGE являются сложными, поскольку существуют множественные формы RAGE, включая клеточную мембранную форму RAGE, которая ответственна за патологическую передачу сигналов, растворимый RAGE, полученный в результате протеолитического расщепления и высвобождения мембраны RAGE, и эндогенный секреторный

RAGE, растворимая форма, генерируемая альтернативной транскрипцией гена RAGE [443]. Растворимые формы RAGE могут быть защитными, поскольку они связывают лиганды RAGE без активации повреждающей провоспалительной передачи сигналов. Снижение уровня растворимого RAGE в плазме является признаком БА и раннего снижения когнитивных функций [134].

Как уже упоминалось, RAGE был идентифицирован как рецептор для AGE-модифицированных белков и впоследствии как один рецептор для A β , однако последующие исследования показали много дополнительных лигандов RAGE, включая HMGB1 (амфотерин), S100B, S100A7, S100A12, S100P, A β , интегрин Mac -1 и фосфатидилсерин. Экспрессия многих из этих лигандов также усиливается в мозге при БА. Из-за разнообразия природы лигандов RAGE стало очевидно, что RAGE является рецептором распознавания образов, связывающимся с лигандами с определенной конформацией, а не последовательностями [239].

Усиленная передача сигналов RAGE, по-видимому, является признаком хронического воспаления, когда присутствуют повышенные концентрации лигандов. В присутствии этих лигандов экспрессирующие RAGE клетки усиливают активацию транскрипционного фактора ядерного фактора kB (NF-kB), что не только приводит к индукции многих воспалительных путей, но также приводит к повышенной экспрессии RAGE, ассоциированной с клетками. Эта особенность усиливает последствия активации RAGE при возникновении патологического повреждения. Значительно усиливается экспрессия RAGE в мозге при болезни Альцгеймера нейронами, микроглией, астроцитами и эндотелиальными клетками в областях мозга с накоплениями A β [269, 405].

1.4. Газовые трансмиттеры как регуляторы формирования локального микроокружения

Одним из перспективных направлений современной нейронауки является возможность коррекции «когнитивного» резерва путем изменением регуляции эндогенных факторов, участвующих в формировании локального микроокружения в нейрогенной нише – источнике стволовых клеток во взрослом головном мозге. Одним из перспективных регуляторов, доказавших свое нейропротекторное действие, может быть газовый трансмиттер – сероводород [166].

Сероводород (H_2S) представляет собой газообразную молекулу и эндогенно продуцируется в мозге под действием ферментов ряда ферментов. Физиологически H_2S действует как нейромодулятор и регулирует синаптическую активность нейронов и глии, чтобы способствовать развитию долгосрочной потенциации. Снижение уровня H_2S в мозге и плазме было напрямую связано со степенью тяжести болезни Альцгеймера у пациентов. Большое количество исследований показали снижение уровня H_2S в экспериментальных моделях когнитивной дисфункции, и было показано, что экзогенное введение гидросульфида натрия ($NaHS$), донора H_2S , предотвращает развитие дефицита памяти. Благоприятные эффекты H_2S в различных моделях были обоснованы снижением нейровоспаления, усилением антиоксидантной защиты, снижением стресса эндоплазматического ретикулума (ER), ингибированием передачи сигналов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3-K) / Akt, ингибированием митоген-активированной протеинкиназы (MAPK), снижением глутамата и нормализацией NMDA-рецепторов, ингибированием матриксных металлопротеиназ (MMPs), активацией молчащего информационного регулятора 1 (Sirt 1) и сохранением митохондриальной функции [166].

Уровни H_2S в плазме отрицательно коррелируют с тяжестью БА. Так было продемонстрировано, что системные инъекции H_2S являются

нейропротекторными на ранней доклинической стадии БА. В недавнем исследовании показана возможная нейропротекция хронического лечения донором H_2S и водой, обогащенной H_2S на трансгенных мыши $3 \times Tg$ с болезнью Альцгеймера. Три месяца лечения H_2S защищали от нарушений в обучении и памяти у мышей с тяжелой моделью $3 \times Tg$ -БА и уменьшали размер бета-амилоидных бляшек с сохранением морфологической картины. Эта нейропротекция проявлялась главным образом в коре и гиппокампе, что связано со снижением активности N-концевых киназ c-jun, внеклеточных сигнальных киназ и p38, которые играют установленную роль не только в фосфорилировании белка тау, но и в воспалительных процессах. Данные результаты убедительно показывают, что соответствующие методы лечения с различными источниками H_2S могут представлять инновационный подход для противодействия раннему и тяжелому прогрессированию БА у людей [395].

1.4.1. Аберрантный ангиогенез и нейрогенез при БА. Роль H_2S в нейрогенезе и ангиогенезе

При БА происходит нарушение ангиогенеза и это играет роль в прогрессировании нейродегенерации. $A\beta$ способствует неоангиогенезу и гиперваскулярности [44], что подтверждается повышенным уровнем проангиогенных факторов - ангиогенина и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-4 - в плазме пациентов с БА [323]. Тем не менее, настоящие данные противоречивы, так как другие авторы обнаружили снижение уровня ангиогенина в сыворотке при БА [211]. В обоих исследованиях была выявлена корреляция между уровнями ангиогенина и тяжестью когнитивных нарушений, вероятно, из-за оценки проявлений заболевания на разных фазах прогрессирования. Другие исследования показали, что ангиогенин стимулирует синтез и высвобождение NO из эндотелиальных клеток [390], тогда как H_2S увеличивает экспрессию ангиогенина в эндотелиальных клетках [133]. Таким образом, заманчиво

предположить, что этот механизм - $[H_2S \rightarrow \text{ангиогенин} \rightarrow NO]$ - не регулируется при БА, тем самым способствуя аномальному ангиогенезу.

H_2S и NO сами по себе служат мощными ангиогенными молекулами, действующими как отдельно, так в комбинации с другими ангиогенными факторами, чтобы способствовать миграции эндотелиальных клеток-предшественников, а также пролиферации [215]. H_2S активирует каналы K_{ATP} , которые обладают ангиогенными свойствами, участвуя в клеточном ответе на действие VEGF и способствуя высвобождению NO из эндотелиальных клеток [393]. Субъединица Kir6.1 каналов K_{ATP} , которая является мишенью для NO -индуцированной нитрации, необходима для ангиогенной активности VEGF [393]. Таким образом, возникает возможность того, что сокращенная и / или несбалансированная продукция H_2S и NO , наблюдаемое при БА, уменьшает ангиогенный потенциал факторов, действующих через K_{ATP} каналы.

Ангиогенез важен не только для репаративных процессов в мозге взрослого человека, но и для поддержания нейропластичности. Мультирегиональная дисрегуляция нейрогенеза, нарушение миграции и созревания нейронов наблюдаются при БА [254]. Микроокружение сосудов в нейрогенной нише интегрируется посредством передачи сигналов молекулами, секретруемыми эндотелиальными клетками сосудистой сети головного мозга, или путем прямого контакта с этими клетками [140]. Эндотелиально-секретуемые факторы из сосудистой сети головного мозга регулируют пролиферацию, выживание / самообновление, дифференцировку и миграцию нервных стволовых клеток / клеток-предшественников в нейрогенных нишах. Существует много паракринных эффекторов сосудистой сети головного мозга на нейрогенез, таких как VEGF, EGF, bFGF, Notch лиганды. Известно, что H_2S непосредственно активирует рецептор VEGF 2 (VEGFR2), обеспечивая таким образом проангиогенный эффект [345].

Сероводород является небольшой и липофильной молекулой и, следовательно, свободно проникает через клеточную мембрану, проявляя цитотоксичность. H_2S генерируется эндогенно определенными ферментами и

играет ключевую роль в сердечно-сосудистой системе, желудочно-кишечном тракте, мочевой и эндокринной системах, а также в центральной нервной системе [166, 283].

H_2S у млекопитающих продуцируется главным образом ферментативными путями. Основными тремя ферментами для образования H_2S являются цистатионин- γ -лиаза (CSE), цистатионин- β -синтаза (CBS) и 3-меркаптопируватсульфуртрансфераза (3-MST) в комбинации с цистеиновой аминотрансферазой (CAT), которые обеспечивают три отдельных пути для превращения L-цистеина в H_2S [166]. В настоящий момент считается, что H_2S имеет больше молекул-мишеней, чем NO или CO, и может играть многообразные роли в норме и при патологии. В частности, появляющиеся данные свидетельствуют, что H_2S участвует в регуляции нейронных функций и сигнализации, включая ноцицепцию. Тем не менее, существуют противоречивые сообщения о нейропротекторных и нейротоксических эффектах H_2S . Поэтому несмотря на полученные данные до сих пор остается открытым вопрос о роли H_2S в центральной нервной системе и его продукции и распределении в пределах нейрогенных ниш [395].

Поскольку эндотелиальные клетки также входят в состав нейрогенной ниши и адекватное локальное кровоснабжение необходимо для процесса нейrogenеза логично предположить, что эта реализация эффектов донора H_2S также будет влиять на формирование локального микроокружения.

Принято считать, что распределение ферментов CBS и CSE в ткани млекопитающих разные в разных органах и тканях.

Некоторые авторы считают, что CSE играет важную роль в продукции H_2S только в сердечно-сосудистой системе, тогда как CBS отвечает за производство H_2S в головном мозге [216], активированными астроцитами из-за сдвига внутриклеточного pH, необходимого для высвобождения H_2S из связанной серы. Тем не менее, именно CSE, но не CBS, был обнаружен в мозговых микрососудах, тогда как экспрессия CBS была выявлена в паренхиме головного мозга [216]. Еще в одном исследовании было

установлено, что путь MST в основном способствует генерации H_2S в мозге и что этот путь регулируется внутриклеточным кальцием (Ca^{2+}) в зависимости от его концентрации [362].

В литературе есть лишь единичные сведения о том, что H_2S оказывает влияние на стволовые клетки, однако остается до сих пор неизвестным, как меняется продукция H_2S на разных этапах нейрогенеза по мере «созревания» нейрональных стволовых клеток [252].

В связи с этим актуальным является изучение путей синтеза эндогенного сероводорода в головном мозге в клетках на разных этапах нейрогенеза в пределах нейрогенных ниш, а также физиологические уровни H_2S в клетках различной природы.

Роль H_2S в центральной нервной системе привлекает в последние несколько лет много внимания [304]. Имеются данные, что H_2S защищает нервные клетки от окислительного стресса, сохраняет фоторецепторные клетки в сетчатке при индуцированной светом дегенерации, регулирует стресс эндоплазматического ретикула [213]. Нейромодуляция и нейропротекция нейронов являются общей чертой H_2S и ферменты, участвующие в его продукции, оказывают влияние на различные патологии, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, церебральная ишемия и болезни Хантингтона. Кроме того, в последнее время обсуждается возможное участие H_2S в развитие демиелизирующих расстройств и дегенеративных нарушений периферических нервов [213].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что газ H_2S может выступать в качестве мощного нейропротективного агента. H_2S защищает клетки от цитотоксичности, вызванной бета-амилоидом. H_2S также защищает нейроны от гипоксии или вызванной окислительным стрессом травмы. Ключевыми механизмами, лежащими в основе нейропротекции H_2S , являются его антиоксидантные и противовоспалительные эффекты [345] (Рисунок 8).

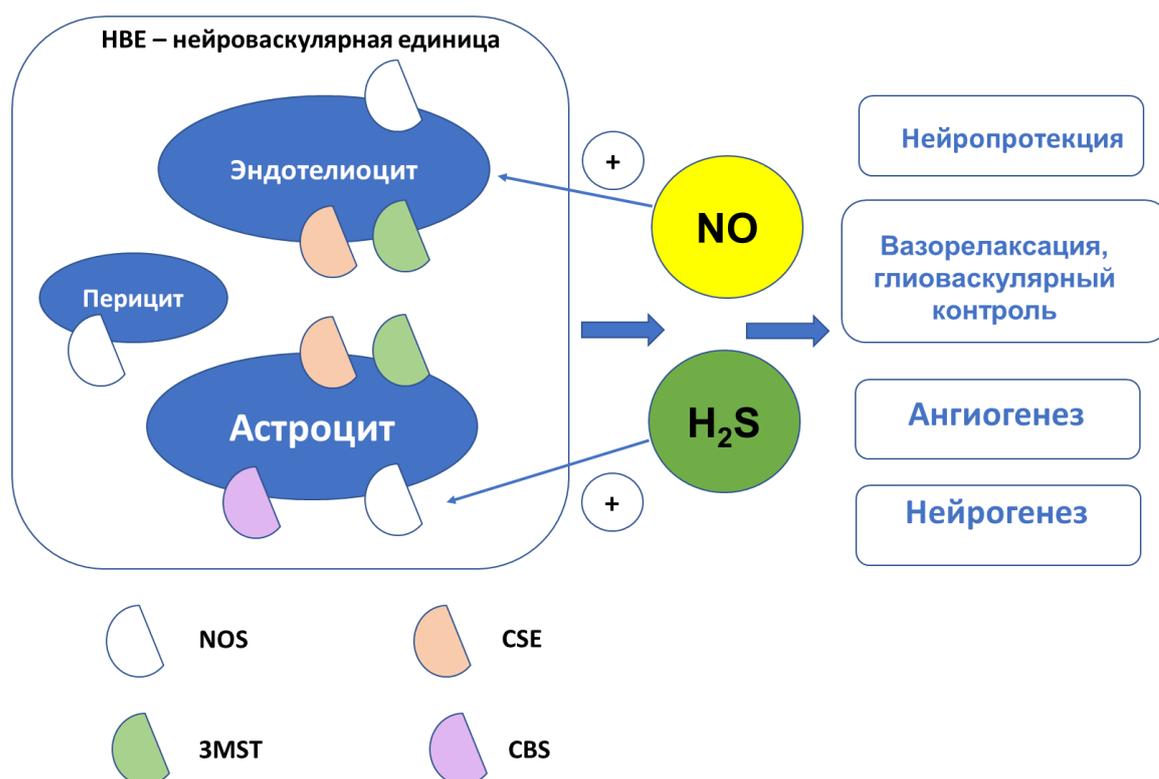


Рисунок 8 – Ключевые механизмы, лежащие в основе нейропротекции H₂S [345].

Астроциты и микроглия играют важную роль в регуляции уровня pH мозга, уровней нейротрансмиттеров и нейрональной возбудимости [399], ассоциированы с прогрессированием нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [89], а также играют важнейшую роль в окружении. H₂S вызывает Ca²⁺ волны в астроцитах, что индуцирует Ca²⁺ ток через каналы в плазматической мембране [214], а также обратимо увеличивает уровни Ca²⁺ в микроглии в дозо-зависимой манере [123]. В дополнение к регуляции гомеостаза Ca²⁺, H₂S может также участвовать в долгосрочной потенциации (LTP) и модуляции различных нейротрансмиттеров [376]. H₂S облегчает LTP в гиппокампа через активацию N-метил-D-аспарататных (NMDA) рецепторов, а также фосфорилирование этих рецепторов протеинкиназой A (PKA) и изменение внутриклеточного уровня Ca²⁺ в астроцитах и срезах гиппокампа [440]. На основе приведенных данных, можно предположить, что H₂S действует как синаптический модулятор, реализуя свой эффект по всей видимости через астроциты [213].

Весьма привлекательным остается изучение экспрессии ферментов, участвующих в продукции H_2S в клетках, которые формируют микроокружение в нейрогенной нише, а именно в астроцитах и эндотелиоцитах [198].

В исследованиях с использованием донора H_2S (NaHS) было показано, что его использование связано с ингибированием апоптоза, способствует снижению отека в головном мозге и улучшению когнитивной дисфункции, что ослабляет развитие ранней черепно-мозговой травмы при субарахноидальном кровоизлиянии [408]. Таким образом, можно сделать вывод, что H_2S оказывает защитное и модулирующее действие на нервные клетки [304].

Недавние данные показали, что L-цистеин (из которого происходит образование эндогенного H_2S) повышал экспрессию факторов, таких как Hes1 и Hes5, что приводит к ингибированию нейрогенеза и способствует глиальной дифференцировке. Следовательно, возможно, что L-цистеин способствует астроцитогенезу, что частично присуще экспрессии транскрипционных факторов, которые затем активируют специфический для астроцитов ген GFAP. Взятые вместе, такие результаты показывают, что L-цистеин участвует в сети транскрипционных факторов с основным доменом типа спираль-петля-спираль (Basic-helix-loop-helix, bHLH), которые определяют судьбу разных популяций клеток-предшественников [213].

В исследовании с донором H_2S - NaHS показали, что H_2S может усилить распространение первичных НСК в культуре, опосредованное путем фосфорилирования ERK1/2. H_2S также способствует дифференцировке НСК в нейроны, влияя по всей видимости на экспрессию генов, связанных с дифференцировкой. Кроме того, H_2S стимулирует нейрогенез в гиппокампе мышей, а также способствует восстановлению нарушенного обучения и памяти при неонатальной гипоксии [408].

Было также продемонстрировано, что H_2S участвует в модулировании клеточной пролиферации. Несколько исследований показали, что введение доноров H_2S , NaHS, стимулирует клеточную пролиферацию в

кардиомиоцитах крыс и интерстициальных клетках. Кроме того, в микромолярных дозах, H_2S проявляет нейропротекторные эффекты через множественные механизмы *in vivo* или *in vitro* [214]. Было показано, что экзогенно введенный NaHS в концентрации 10 и 20 мкМ увеличивает рост эндотелиальных клеток, тогда как высокие концентрации NaHS (500 и 1000 мкМ) приводили к значительному снижению жизнеспособности клеток. Кроме того, было обнаружено, что более низкая доза NaHS (0,5, 1 и 5 мкМ) значительно увеличивает распространение первичных НСК. Несоответствие результатов по эффектам H_2S может быть связано с типом клеток, используемым в разных исследованиях. Таким образом, можно суммировать, что реализация протекторного действия сероводорода во многом зависит от дозы и клеток-мишеней, а также от происхождения сероводорода. В связи с этим возникает задача исследовать эндогенную продукцию H_2S на регенеративный потенциал нейрональных стволовых клеток [435].

Поскольку основное внимание в настоящее время при разработке лечения уделяется технологиям регенеративной терапии при нейродегенеративных заболеваниях, в основе исследования лежит изучение роли эндогенного H_2S в опосредовании поведенческих реакций и его вклада в формирование локального микроокружения в нейрогенной нише и восстановления когнитивного резерва головного мозга.

Таким образом, расшифровка молекулярных механизмов влияния клеток-эффекторов, гуморальных медиаторов, газовых трансмиттеров на нейрогенез не только расширит наши представления о механизмах структурной и функциональной пластичности мозга, но и позволит идентифицировать новые молекулы-мишени для фармакологической коррекции хронической нейродегенерации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Работа носит экспериментальный характер. Все результаты были получены на грызунах: крысах и мышах разных линий. В исследовании использовались крысы-самцы линии Wistar, в возрасте 4 месяцев весом 250-300 г (n=28); мыши-самцы линии CD1, в возрасте 4 месяцев, весом 25-30 г (n=14); мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте 3-4 месяцев, весом 25-30 г (n=61); мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия B6SLJ Tg(APPswFILon,PSEN1*M146L*L286V)6799Vas/Mm), самцы в возрасте 4 месяцев весом 25-30 г (n=10); *Nlrp3*-нокаутные животные (линия B6.129S6-Nlrp3^{tm1Bhk/J}) на генетическом фоне C57BL/6, самцы в возрасте 4 месяцев весом 25-30 г (n=30); *CSE*-нокаутные мыши на генетическом фоне C57BL/6 (n=10), *RAGE*-нокаутные мыши на генетическом фоне C57BL/6, самцы в возрасте 4 месяцев весом 25-30 г (n=10); n=7-10 для каждой группы.

Часть экспериментов выполнена *in vitro*. С этой целью были использованы мыши линии C57Bl6 в возрасте 10-14 суток постнатального развития для получения нейросфер.

Грызунов содержали в индивидуально-вентилируемых клетках по 5-6 особей с соблюдением температуры в виварии 21-22°C со свободным доступом к воде и гранулярному 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/ЕС) и с разрешения биоэтической комиссии при КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

2.2. Дизайн эксперимента и группы животных

Диссертационное исследование состоит из девяти блоков:

Блок I. Изучение особенностей нейрогенеза и субпопуляций астроцитов в нейрогенной нише головного мозга в норме и при нейродегенерации: роль когнитивной стимуляции. Экспрессия NLRP3 инфламмасом на разных этапах нейрогенеза. Исследуемые маркеры представлены в таблице (Таблица 2).

Блок II: Изучение ранних изменений в гиппокампальном нейрогенезе, вызванных инъекцией олигомеров бета-амилоида: влияние на процессы кратковременной и отсроченной памяти. Изучение экспрессии NLRP3 инфламмасом и медиаторов воспаления в нейрогенных нишах в норме и при нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией. Исследуемые маркеры представлены в таблице (Таблица 3).

Блок III: Экспрессия NLRP3 инфламмасом на клетках нейрональной и глиальной природы в пределах нейрогенной ниши в семейной модели болезни Альцгеймера. Изучение эмоциональной ранней и отсроченной памяти у мышей с болезнью Альцгеймера (с использованием трансгенных 5xFAD мышей).

Блок IV: Изучение эффекта введения олигомеров бета-амилоида на экспрессию генов раннего реагирования после тестирования когнитивных функций. Экспрессия маркеров ангиогенеза и RAGE.

Блок V: Изучение роли NLRP3 инфламмасом в процессах нейрогенеза и ангиогенеза, синаптической передачи и формировании астроцитов. Исследование поведенческого фенотипа мышей, не экспрессирующих NLRP3 инфламмасомы (с использованием *Nlrp3*-нокаутных мышей). Исследуемые маркеры представлены в таблице (Таблица 4).

Блок VI: Исследование роли NLRP3 в трансинаптической передаче и формирование памяти в норме и при моделировании болезни Альцгеймера. Влияние NLRP3 инфламмасом на метаболизм глюкозы (с использованием *Nlrp3*-нокаутных мышей).

Блок VII: Роль эндогенного газового транмиттера H₂S, продуцируемого эндотелиоцитами, в процессах раннего нейрогенеза, формировании клеток астроглиальной природы и экспрессии NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина. Влияние делеции гена *CSE* на когнитивные функции и тревожность.

Блок VIII: Исследование роли рецепторов конечных продуктов гликирования белков (RAGE) в процессах нейрогенеза.

Блок IX: Оценка пролиферации нейрональных предшественников при модуляции активности клеток астроглии в микроокружении нейрогенной ниши в норме и при действии олигомеров бета-амилоида *in vitro*.

Стадия	Пролиферация			Дифференцировка и миграция	Созревание		
	Плюри-потентные СК	Мульти-потентные СК	Базальная прогениторная клетка		Зрелый нейрон	Зрелый фиброзный астроцит	Зрелый протоплазматический астроцит
Исследуемые маркеры нейрогенеза	CD133	Nestin	Рах6	PSA-NCAM	NeuN	GFAP	S100beta
Экспрессия NLRP3	CD133/NLRP3	Nestin/NLRP3		PSA-NCAM/NLRP3	NeuN/NLRP3	GFAP/NLRP3	S100β/NLRP3
Пролиферирующие клетки	Ki67, PCNA, BrdU			PSA-NCAM/BrdU	NeuN/BrdU		
Гены раннего реагирования	Arc/Arg3.1						
NAD ⁺ конвертирующие ферменты					CD38/NeuN CD157/ NeuN	CD38/ GFAP; CD157/ GFAP	

Таблица 2 – Исследуемые маркеры в эксперименте (Блок I)

Стадия	Пролиферация		Дифференцировка и миграция	Созревание			Выживаемость
	Плюри-потентные СК	Мульти-потентные СК		Зрелый нейрон	Зрелый фиброзный астроцит	Зрелый протоплазматический астроцит	
Тип клеток			Нейробласт				

Исследуемые маркеры	CD133	Nestin	PSA-NCAM	NeuN	GFAP	S100beta	TUNEL
Экспрессия NLRP3	CD133/NLRP3	Nestin/NLRP3			GFAP/NLRP3	S100 β /NLRP3	
Пролиферирующие клетки	Ki67, BrdU		BrdU	NeuN/BrdU			
Медиаторы воспаления					GFAP/IL1 β ; GFAP/HMGB 1		

Таблица 3– Исследуемые маркеры в эксперименте (Блок II)

Стадия	Пролиферация	Дифференцировка и миграция	Созревание	
Тип клеток	Мультипотентные СК	Нейробласт	Зрелый нейрон	Зрелый фиброзный астроцит
Исследуемые маркеры	Nestin/GFAP P	NeuroD1, DCX	NeuN	GFAP
Ангиогенез	VEGF			

Таблица 4 – Исследуемые маркеры в эксперименте (Блок V).

Группы животных

Блок I. *1 группа* – животные (крысы) с введением PBS (ложно-оперированные животные) с когнитивной тренировкой (обучением) в течение 5 дней в водном лабиринте Морриса (ВЛМ) (n=7);

2 группа – крысы с введением PBS (ложно-оперированные животные) без когнитивной тренировки (обучения) в водном лабиринте Морриса (n=7);

3 группа – крысы с введением растворимых форм олигомеров бета-амилоида 1-42 с когнитивной тренировкой (обучением) в течение 5 дней в ВЛМ (n=7);

4 группа – крысы с введением растворимых форм олигомеров бета-амилоида 1-42 без когнитивной тренировки (обучения) в ВЛМ (n=7).

Согласно хронологии эксперимента после проведения операции, через 10дневный промежуток времени крысы 1 и 3 группы обучались в парадигме водного лабиринта Морриса. Крысы 2 и 4 группы (без тренировки) тестировались однократно в ВЛМ с последующей эвтаназией и забором головного мозга. Схема-дизайн эксперимента первого блока представлена на рисунке 9.

Блок II: *1 группа* – мыши линии CD1 с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в СА1 зону гиппокампа – контрольная группа ложно-оперированных мышей (n=7).

2 группа – мыши линии CD1 с введением $A\beta$ 1-42 в СА1 зону гиппокампа (n=7) экспериментальная группа мышей с моделью болезни Альцгеймера. Схема-дизайн эксперимента данного блока представлена на рисунке 10.

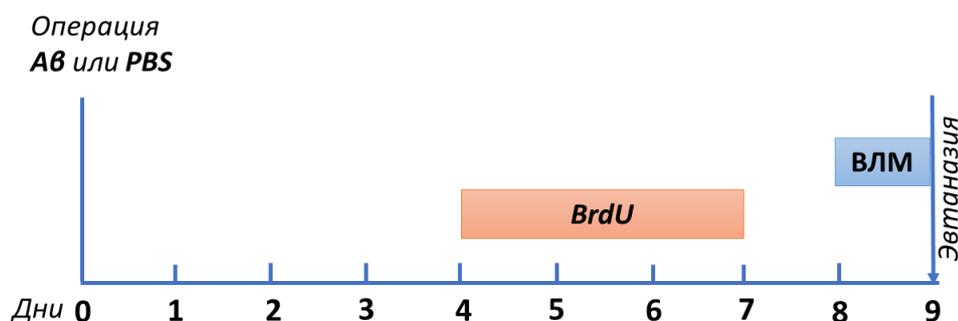
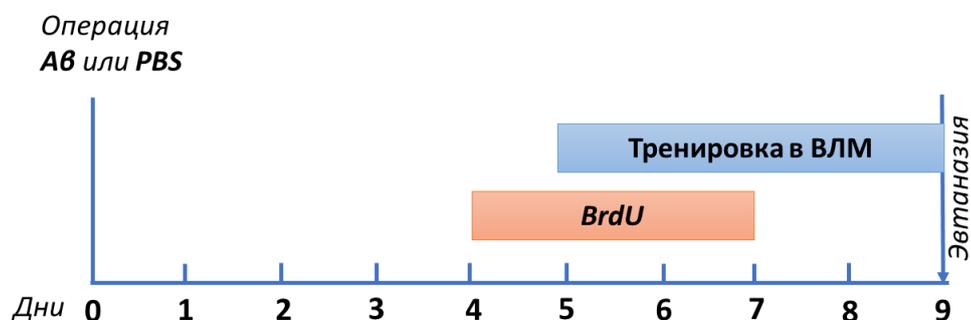


Рисунок 9 – Схема-дизайн эксперимента. Блок I. Операция $A\beta$ или PBS – инъекция бета-олигомеров или фосфатно-солевого буфера в СА1 зону гиппокампа. BrdU – инъекция внутрибрюшинная бромдезоксигуанидина с целью изучения миграции и пролиферации клеток (описание в методике). ВЛМ – водный лабиринт Морриса.

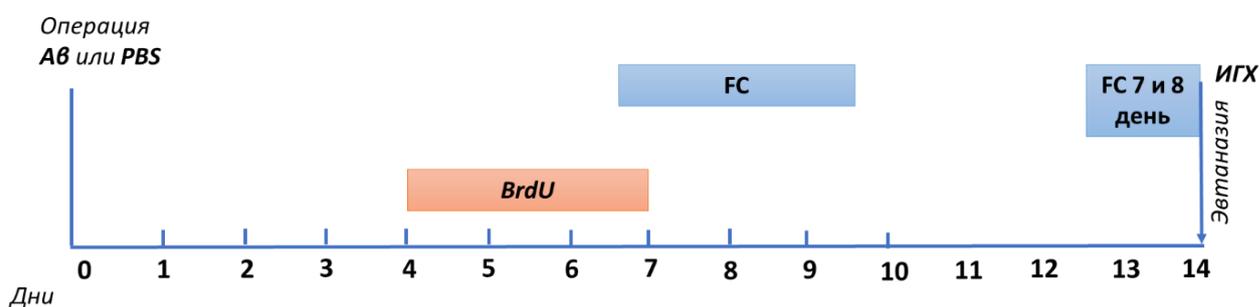


Рисунок 10– Схема-дизайн эксперимента. Блок II. Операция $A\beta$ или PBS – инъекция бета-олигомеров или фосфатно-солевого буфера в СА1 зону гиппокампа. BrdU – инъекция внутрибрюшинная бромдезоксигуанидина с целью изучения миграции и пролиферации клеток (описание в методике). FC – тест «Условно-рефлекторного замиранья» для изучения кратковременной и отсроченной (7 и 8 дни) памяти. ИГХ – иммуногистохимия.

Блок III:

1 группа – мыши линии C57BL/6 (n=7) – контрольная группа

2 группа – мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия B6SLJ Tg(APP^SwFILon,PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799Vas/Mm) (n=10) – экспериментальная 5x^{FAD} модель. Схема-дизайн эксперимента данного блока представлена на рисунке 11.

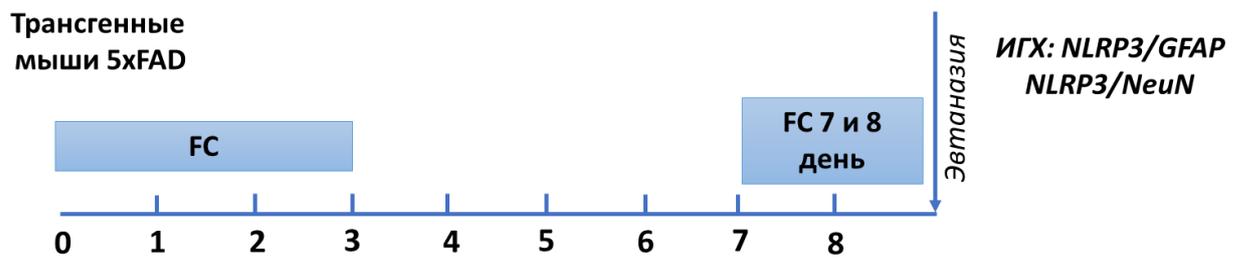


Рисунок 11 – Схема-дизайн эксперимента. Блок III. FC – тест «Условно-рефлекторного замирания» для изучения кратковременной и отсроченной (7 и 8 дни) памяти. ИГХ – иммуногистохимия.

Блок IV: *1 группа* – мыши линии C57BL/6 с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в СА1 зону гиппокампа (n=10) – контрольная группа.

2 группа – мыши линии C57BL/6 с введением Аβ1-42 в СА1 зону гиппокампа (n=10) – экспериментальная группа. Схема-дизайн эксперимента данного блока представлена на рисунке 12.

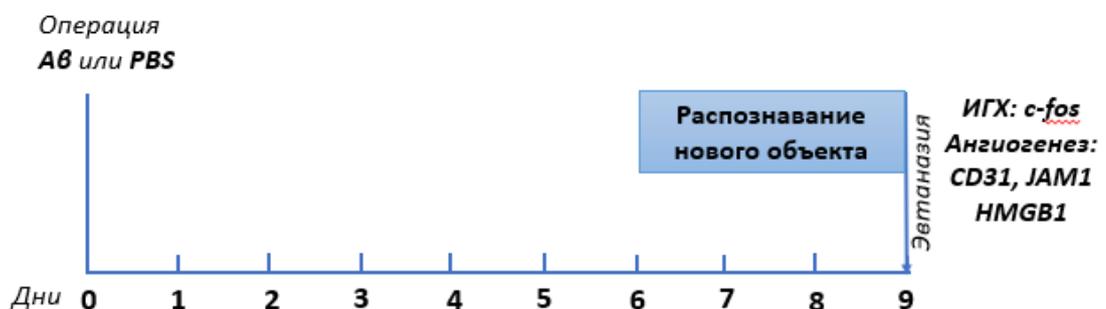


Рисунок 12 – Схема-дизайн эксперимента. Блок IV. Операция Аβ или PBS – инъекция бета-олигомеров или фосфатно-солевого буфера в СА1 зону гиппокампа. Тест «Распознавание нового объекта» – описание в методах. ИГХ – иммуногистохимия.

Блок V: *1 группа* – мыши линии C57BL/6, мыши дикого типа WT (n=7) – контрольная группа.

2 группа – *Nlrp3*-нокаутные мыши (n=10) – *Nlrp3*^{-/-} или NLRP3 KO – экспериментальная группа. Схема-дизайн эксперимента данного блока представлена на рисунке 13.



Рисунок 13 – Схема-дизайн эксперимента. Блок V. *Nlrp3*^{-/-} – мыши с делецией гена *Nlrp3*. ОП – тест «Открытое поле», ПКЛ – тест «Приподнятый крестообразный лабиринт», ТСК – тест «Темно-светлая камера», Трехкамерная активность – тест «Трехкамерный тест на социализацию», FC – тест «Условно-рефлекторного замиранья» для изучения кратковременной и отсроченной (7 и 8 дни) памяти – описание в методах. ИГХ – иммуногистохимия.

Блок VI: 1 группа – мыши C57BL/6 с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в СА1 зону гиппокампа (n=10) – WT+PBS.

2 группа – мыши C57BL/6 с введением Аβ1-42 в СА1 зону гиппокампа (n=10) – WT+Аβ.

3 группа – *Nlrp3*-нокаутные животные с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в СА1 зону гиппокампа (n=10) – NLRP3 KO+PBS.

4 группа – *Nlrp3*-нокаутные животные с введением Аβ1-42 в СА1 зону гиппокампа (n=10) – NLRP3 KO+ Аβ. Схема-дизайн эксперимента данного блока представлена на рисунке 14.

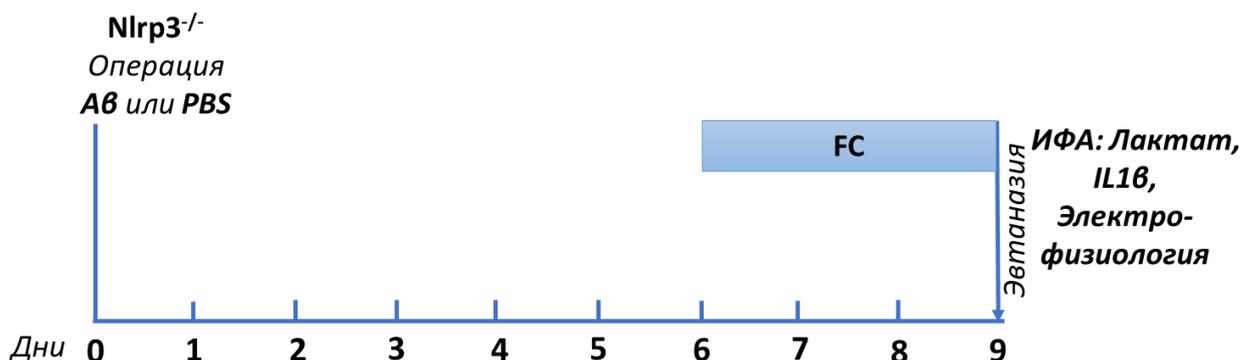


Рисунок 14– Схема-дизайн эксперимента. Блок VI. *Nlrp3*^{-/-} – мыши с делецией гена *Nlrp3*. Операция Аβ или PBS – инъекция бета-олигомеров или фосфатно-солевого буфера в СА1 зону гиппокампа. FC – тест «Условно-рефлекторного замирания» – описание в методах. ИГХ – иммуногистохимия.

Блок VII:

1 группа – мыши линии C57BL/6, мыши дикого типа WT (n=7) – контрольная группа.

2 группа – *CSE*-нокаутные мыши(n=10) – *CSE3*^{-/-} или *CSE* KO – экспериментальная группа. Схема-дизайн эксперимента данного блока представлена на рисунке 15.



Рисунок 15 – Схема-дизайн эксперимента. Блок VII. *CSE*^{-/-} – мыши с делецией гена *CSE*. ОП – тест «Открытое поле» – описание в методах. ИГХ – иммуногистохимия.

Блок VIII: 1 группа – мыши линии C57BL/6, мыши дикого типа WT (n=7) – контрольная группа.

2 группа – *RAGE*-нокаутные мыши (n=10) – *RAGE*^{-/-} или *RAGE* KO – экспериментальная группа. В данном блоке у мышей исследовали маркеры раннего нейрогенеза.

Блок IX: 1 группа – контрольная (сокультура нейросфер с астроцитами (n=7));

2 группа – контрольная с фотоактивацией (сокультура нейросфер с астроцитами, которые подверглись фотоактивации (n=7));

3 группа – экспериментальна-амилоид – нейросферы, культивируемые в присутствии β-амилоида и астроцитов (n=7);

4 группа – экспериментальная-амилоид* – нейросферы, культивируемые в присутствии β -амилоида и астроцитов, которые подверглись фотоактивации (n=7).

2.3. Моделирование болезни Альцгеймера

Для моделирования болезни Альцгеймера использовали стереотаксический метод с применением протокола введения растворимых олигомерных форм амилоида $A\beta$ 1-42 в гиппокамп мышей или крыс [106].

Стереотаксическая хирургия

Анестезию осуществляли инъекцией хлоралгидрата внутривенно (400 mg/kg) и ксилазина внутримышечно. После достижения необходимого уровня анестезии проводили оперативный доступ и инъекцию бета-амилоида. Бета-амилоид $A\beta$ 1-42 (Sigma-Aldrich) растворяли в стерильном 0,1 М PBS (pH 7,4) и готовили раствор в концентрации 50 μ M. Для получения растворимых олигомеров бета-амилоида $A\beta$ 1-42 агрегировали путем инкубации при 37°C в течение 7 дней перед введением. Полученные олигомеры $A\beta$ 1-42 вводили интрагиппокампально в CA1 зону по стереотаксическим координатам ML \pm 1,3 мм, в AP - 2,0 мм. DV - 1,9 мм. с двух сторон с помощью микрошприца (Hamilton). Для введения бета-амилоида операцию проводили в стереотаксической рамке с адаптером для мышей и крыс (Neurostar, Germany). Мышам опытных групп вводили 1 мкл $A\beta$ 1-42, для животных контрольной группы инъецировали 1 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) для исключения влияния стресса операции. Крысам с целью моделирования болезни Альцгеймера вводили по 5 мкл $A\beta$ 1-42 и 5 мкл PBS для проведения ложной операции.

Введение BrdU

BrdU (Sigma, USA) вводили внутривбрюшинно мышам и крысам экспериментальной и контрольной групп для изучения радиальной миграции нейробластов в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. Чтобы идентифицировать мигрирующие нейробласты субгранулярной зоне и степень их миграции в гранулярный слой, BrdU (50 мг/кг, внутривбрюшинно) вводили два раза в день в течение 3 последовательных дней, начиная с 4 дня после инъекции бета-амилоида или PBS [373]. Эвтаназию животных проводили три дня спустя (т.е. через 9 дней после введения бета-амилоида).

2.4. Нейроповеденческое тестирование животных

Тест «Открытое поле»

Данный тест используется для оценки эмоционального поведения. Тест предоставляет уникальную возможность систематически оценивать исследовательскую активность в окружающей среде, общую двигательную активность и обеспечивает начальный анализ поведения, связанного с тревогой [321]. Предполагается, что два фактора влияют на поведение, подобное тревожности, в открытом поле. Во-первых, это социальная изоляция, возникающая в результате физического отделения от сородичей в клетке при выполнении теста. Вторым является стресс, создаваемый ярко освещенной, незащищенной, новой тестовой средой [353].

С помощью данного теста можно сделать заключение об основных трех аспектах поведения: 1) общей локомоторной активности путем регистрации общей дистанции (в метрах) в течение всего времени тестирования; 2) исследовательской активности (предпочтение исследовать центральную часть и/или помещенный в центр поля живой/неживой объект; 3) тревожное поведение за счет оценки тенденции оставаться близко к стенкам поля (тигмотаксис) и снижением времени нахождения в центре [255, 353].

Установка для тестирования представляет собой круглую арену диаметром 63 см с высотой стенок 32 см (НПК Открытая Наука, Россия). В

течение сессии тестирования проводится видеофиксация с последующей обработкой исследуемых параметров в тесте с помощью программного обеспечения ANY-MAZE. В программе задаются размеры поля (для оценки пройденной дистанции), а также очерчивается центральная зона (для разделения времени и дистанции, пройденной мышами в каждой из зон: центральной и периферической). Диаметр центральной зоны составил 30 см.

Поскольку существуют различные модификации данного теста, в эксперименте были сделаны несколько сессий.

После 10 минут пребывания в открытом поле (сессия привыкания) был выполнен тест в открытом поле с неодушевленным (вторая сессия), а затем одушевленным объектом в центральной зоне (третья сессия). Эти сессии были проведены в арене открытого поля для оценки страха перед новым несоциальным объектом (неодушевленным) и изучением социального предпочтения (живой объект). Несоциальный объект был размещен в центре поля. В ходе второго сеанса мышь помещали в камеру открытого поля с новым несоциальным объектом на 10 минут. Впоследствии несоциальный объект был заменен на социальный (для мышей C56BL/ 6 самец такой же линии соответствующего возраста, который находился под небольшим проволочным колпаком (70 × 90 × 70 мм, со стержнями, расположенными на расстоянии 5 мм друг от друга). Средний интервал времени между сеансами составляет 2–3 минуты [255].

В каждой сессии оценивали: дистанцию, пройденную в открытом поле; время в центральной части открытого поля, число входов в центр, а также дистанцию в центральной части. В сессиях с объектами оценивали также число подходов и время, проведенное с несоциальным/социальным объектом.

После завершения тестирования арену обрабатывали стандартным образом.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) является широко используемым тестом для поведенческого анализа у грызунов. Его

использование было подтверждено для оценки анти-тревожного действия фармакологических агентов, а также для определения областей мозга и механизмов, лежащих в основе поведения, связанного с тревогой [404].

Поведенческие реакции в приподнятом лабиринте легко оцениваются и количественно оцениваются наблюдателем после записи с помощью программного обеспечения ANY-MAZE. Для выполнения теста рызунов помещают на пересечении четырех рукавов приподнятого крестообразного лабиринта и регистрируют их поведение в течение 5 минут. Это было основано на ранних исследованиях, которые показали, что грызуны демонстрируют наиболее устойчивые реакции избегания в первые 5 минут после размещения в открытых частях теста. Поведение в этом тесте (то есть активность в закрытых и открытых рукавах) отражает конфликт между предпочтением грызунов находиться в защищенном месте (закрытые рукава) и их врожденной мотивацией исследовать новую среду (открытые рукава). Противотревожное поведение может быть определено путем фиксации увеличенного времени пребывания в открытых рукавах и/или увеличения числа входов в открытые рукава [404].

Для тестирования была использована установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» (OpenScience, НПК Открытая Наука, Россия). Крестообразная арена лабиринта была приподнята поставлена на специальную тележку, которая обеспечивает подъем арены.

Протокол выполнения:

Перед выполнением теста за час клетки с грызунами приносятся в комнату тестирования. Исследуемую особь помещают в месте соединения открытых и закрытых рукавов (в центре) лицом к открытому рукаву. Тестирование проводят в течение пяти минут с видеозаписью. После тестирования грызуна помещают в транспортную клетку и затем возвращают в домашнюю клетку. После каждой особи лабиринт обрабатывают 70% спиртом и высушивают бумажными полотенцами.

Для интерпретации полученных результатов используют следующие параметры: время нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах; общая пройденная дистанция; дистанция, пройденная, в открытых и закрытых рукавах, а также процент входов в открытые и закрытые рукава от общего числа входов [404].

Тест «Темно-светлая камера»

Тест «Темно-светлая камера» (или тест «Черно-белая камера») основан на врожденном предпочтении грызунов к слабо освещенным областям и на спонтанном исследовательском поведении грызунов в ответ на слабые стрессоры, то есть на новую среду и свет. Тест перехода между черным и белым отсеками может быть полезен для прогнозирования анксиолитической или анксиогенной активности у мышей. Тестирование выполняли согласно стандартной методике [83].

Сама установка состояла из двух разделенных отсеков – светлого и темного. Испытательное устройство состоит из коробки, разделенной на две части: темную камеру (200 × 200 × 200 мм) и светлую камеру (200 × 200 × 200) с ярким освещением. Светлый отсек был ярко освещен (250 люкс), тогда как другой отсек был темным (2 люкс). Мышей помещали в светлую часть установки и позволяли свободно перемещаться между двумя отсеками в течение 10 минут. Каждую экспериментальную мышь помещали в центр светлой камеры, и мышь могла свободно перемещаться между двумя камерами в течение 10 минут. Видеофиксация проводилась с помощью программного обеспечения ANY-MAZE. Фиксировали латентное время первого входа в темную зону, время, проведенное в темной и светлой камерах, расстояние, пройденное в светлой камере [255].

Тест «Пятипопыточный социальный»

Социальная память и распознавание необходимы для создания и поддержания колонии мышей. Память социального распознавания важна для

формирования социальной иерархии, распознавания сородичей и потомства, межвидового распознавания.

Пятипопыточный социальный тест оценивает социальную память, а именно способность распознавать новых и знакомых животных. За нескольких взаимодействий грызуны привыкают к другой особи и больше не находят их такими же интересными, как совершенно новую особь.

Во время тестирования субъекту дают возможность для четырех кратких контактов (по одной минуте) в одной клетке с одной и той же особью. В пятой попытке субъект встречает совершенно новую особь. Все попытки записываются на видео и впоследствии анализируются для полного исследования взаимодействия особей (аногенитального исследования, периорального исследования, обнюхивания, поведения избегания и других взаимодействий). Этот тест чаще всего используется для выявления нарушений социального взаимодействия, а также социальной памяти. Для анализа используется время, затраченное испытуемой особью на контакт с другой, подсаживаемой особью.

Трехкамерный тест на социализацию

Тест на социализацию и социальное предпочтение проводили с использованием трехкамерного бокса, чтобы оценить, склонны ли мыши-субъекты исследования проводить время с незнакомыми мышами. Мышей тестировали во время светлой фазы, после 30-минутного периода привыкания в комнате для тестирования, как было описано ранее [1].

Установка для тестирования (60 x 40 x 40 см) состоит из трех прямоугольных поликарбонатных камер, разделительных стенками с небольшими проемами, обеспечивающими доступ в каждую камеру (НПК Открытая наука, Россия). Экспериментальную мышь сначала помещали в центральную часть камеры и позволяли исследовать все отсеки в течение 5-минутного периода привыкания. Каждая из двух сторон содержала пустой цилиндр с проволочными стенками (70 × 90 × 70 мм, стержни располагались на расстоянии 5 мм друг от друга).

На втором этапе теста оценивалась социализация. Под социализацией понимают поведение, когда экспериментальная мышь проводит больше времени в камере с новой мышью, чем в камере с новым объектом [238]. Незнакомая мышь (соответствующего возраста, самец C57BL/6) помещалась в пустой цилиндр с проволочными стенками, находящийся в левой камере, в то время как второй цилиндр в правой камере оставался пустым. Тест на социализацию проводили в течение 10 минут, в течение которых экспериментальной мыши давали возможность исследовать все компартменты. Время, проведенное в каждой камере, записывалось видеокамерой и анализировалось с использованием программного обеспечения ANY-MAZE.

На третьем этапе теста оценивалось предпочтение социальной новизны. Предпочтение социальной новизны было определено количественно путем предоставления тестовой мыши выбора между первой, теперь уже знакомой мышью (особь 1), которая осталась в левом отсеке камеры, и второй незнакомой мышью (особь 2) в правом отсеке (вместо несоциального объекта). Экспериментальной мыши дали 10 минут, чтобы исследовать все три камеры. Предпочтение социальной новизны определяется как большее время, проведенное в камере с особью 2, чем время, проведенное в камере с особью 1. После тестирования установку обрабатывали согласно стандартной методике [238].

Тест «Распознавание нового объекта»

Данный тест позволяет оценить отношения между новизной предоставляемого стимула и поведением мыши. Новизна как понятие представляет собой изменение ожидаемой вероятности события на основе как предыдущей информации, так и внутренних оценок условных вероятностей. Более важным, чем определение новизны, является знание того, что на животных может воздействовать новый стимул. Новые стимулы могут изменять поведение животных, вызывать стрессовые реакции, стимулировать

повышение уровня кортикостерона в плазме, что является основным показателем стресса и предполагает, что такие условия вызывают стресс [30].

Поведенческие тесты, которые оценивают способность распознавать ранее представленные стимулы, составляют основу изучения памяти у животных [37]. Среди наиболее часто и успешно используемых тестов – открытое поле с различными предоставляемыми заданиями (социальный/несоциальный объект), тест распознавания нового объекта (NOR) [105]. Эти тесты обычно оценивают поведение животного, когда оно подвергается воздействию нового и знакомого объекта. Следует особо отметить, что в тесте распознавания нового объекта какое-либо вознаграждение животного за выполнение теста отсутствует, и животные исследуют новый объект как их естественную склонность к новизне, а, следовательно, можно оценить индекс распознавания стимула [37].

Как упоминалось ранее, когда животные подвергаются воздействию знакомого и нового объекта, они часто приближаются и тратят больше времени на изучение нового, чем на знакомый объект [105].

В связи с этим такие парадигмы как «Распознавание нового объекта», которые оценивают память распознавания и, в частности, память распознавания объектов, становятся весьма полезными инструментами для фундаментальных и доклинических исследований, поскольку позволяют изучать нейронные основы памяти [30, 105].

Процедура выполнения теста «Распознавание нового объекта» Как уже было отмечено, задача данного теста оценить способность грызунов распознавать новый объект в окружающей среде. По сути, в тесте отсутствуют положительные или отрицательные подкрепления, и эта методология оценивает естественное предпочтение новых объектов. Процедура теста состоит из трех этапов: привыкание, ознакомление и этап тестирования. В фазе привыкания каждому животному разрешено свободно исследовать арену в открытом поле в отсутствие объектов. Животное затем удаляется с арены и помещается в клетку для содержания. На следующий день (через 24 часа) во

время фазы ознакомления одно животное помещается на арену открытого поля, содержащее два идентичных объекта (A + A) на 10 минут. Чтобы предотвратить принуждение к исследованию объектов, грызунов выпускают к центру противоположной стены спиной к объектам. По истечении интервала в 24 час, на этапе тестирования животное возвращается на арену открытого поля с двумя объектами, один из которых идентичен образцу из дня ознакомления, а другой - новый (A + B) [105, 241].

Как на этапе ознакомления, так и на этапе тестирования объекты расположены в противоположных и симметричных углах арены, а расположение нового и знакомого объектов уравновешено. Нормальные грызуны без нарушений памяти тратят больше времени на изучение нового объекта в течение первых нескольких минут фазы тестирования, и когда наблюдается такое поведение предполагают, что животное может вспомнить и отличить один объект от другого [30].

Концепция исследования объекта

Понятие, которое требует пояснения, что означает «исследование объекта». Такое понятие было определено как исследование объекта при направлении носа на расстоянии ≤ 2 см к объекту и / или касание непосредственно носом, при этом повороты вокруг или сидение на объекте не рассматривается как исследование объекта [30]. Для программного комплекса ANY-MAZE «исследование объекта» определялось как близкая ориентация морды животного по отношению к объекту.

Анализ результатов и используемые индексы

Взаимосвязь между объемом исследования на этапе ознакомления и последующей памятью распознавания объектов может быть оценена с помощью индексов: индекс различия (*Discrimination Index, DI*) и индекс распознавания (*Recognition Index, RI*).

Индекс различия (DI) позволяет различать новые и знакомые объекты, т. е. использует разницу во времени исследования, затраченного на исследование знакомого объекта, с последующим делением этого значение на

общее время исследования нового и знакомого объектов $[DI = (T_N - T_F)/(T_N + T_F)]$, где T_N – время изучения «нового объекта»; T_F – время изучения «знакомого объекта». Полученный результат может варьироваться между +1 и -1, где положительная оценка указывает на большее время, проведенное с новым объектом, отрицательная оценка указывает на большее время, проведенное со знакомым объектом, а нулевая оценка указывает на нулевое предпочтение [30].

Со временем были разработаны другие индексы изучения в данном тесте. Процент времени, потраченного на исследование нового объекта, относительно общего времени, затраченного на исследование обоих объектов, может быть мерой распознавания нового объекта. Эта концепция может быть представлена индексом распознавания (RI), т. е. временем, потраченным на исследование нового объекта относительно общего исследования объекта $[RI = T_N/(T_N + T_F)]$, где T_N – время изучения «нового объекта»; T_F – время изучения «знакомого объекта» и этот показатель является основным показателем способности запоминать [56].

Нейрональные процессы и структуры мозга, участвующие в тесте распознавания нового объекта

Считается, что консолидация памяти является гиппокамп-зависимой. Во время выполнения теста память консолидируется, и пространственные или контекстные характеристики объектов могут быть перемещены в разные части мозга [294]. Однако, когда данная память восстанавливается в присутствии новизны, она переходит в лабильную фазу и требует стабилизации для сохранения. Этот типа процесса называется реконсолидацией, и она участвует в реорганизации уже сформированных воспоминаний, что позволяет включать новую информацию [77]. Известно, что скорость нейрогенеза в гиппокампе связана с консолидацией пространственной памяти [224].

Таким образом, гиппокамп и парагиппокампальная кора играют разные роли в памяти распознавания объектов. В то время как парагиппокампальная кора задействована в распознавании объекта, когда это необходимо для

представления базовой информации о знакомстве или новизне объекта, гиппокамп участвует в запоминании объекта путем кодирования информации об опыте объекта. Распознавание объектов в парагиппокампальной коре быстро затухает и недостаточно для поддержания информации об объекте в течение более длительных интервалов хранения, в то время как гиппокамп, кодируя память объекта, сохраняет сильные предпочтения нового объекта после длительных, но не коротких задержек [158].

Влияние новизны и «ознакомленности» на память

В новизне участвуют процессы выявления, внимания и мотивации. Когда появляется что-то новое, животные остаются настороже и должны внимательно или отдаленно, в зависимости от риска, изучить объект. С другой стороны, если что-то уже знакомое присутствует, это потребует внимания и переоценки. Однако, когда новые и знакомые стимулы присутствуют вместе, новый стимул будет изучен более внимательно, пока не потеряет свою новизну. Это уменьшение новизны означает, что объект становится знакомым, что напрямую связано с задержкой. При более длительных задержках память о знакомых объектах становится слабее, в то время как при небольших задержках она становится практически интактной. Когда есть контакты с новым объектом, интенсивность его исследования зависит от количества остаточной памяти знакомого стимула с определенным интервалом задержки, который требует обновления и повторной консолидации [104].

Кроме того, субъект исследует знакомый объект из-за некоторых остатков прошлого опыта. Тем не менее, предпочтение новизны наблюдается только тогда, когда память доступна, что называется недавней фазой памяти. Если задержка между фазой ознакомления и фазой тестирования увеличивается, появится знакомое предпочтение. Это называется фазой удаленной памяти. Промежуточная фаза находится между этими двумя фазами, когда равное внимание уделяется новым и знакомым стимулам. Более того, может иметь место нулевое предпочтение, которое является не результатом забвения, а изменяющимся предпочтением, когда память имеет

промежуточный доступ [30, 104] интерес для нейробиологов. Поведение животного должно быть определено количественно с использованием визуальных или механических мер конкретного ответа. Одним из способов выяснения механизмов, участвующих в отдельных учебных сессиях, является изучение процессов ассоциативного обучения. Упрощенно, ассоциативное обучение – это адаптивный процесс, который позволяет организму учиться предвидеть события. Одной из форм такого обучения является тест «Условно-рефлекторного замирания» (Fear conditioning, FC).

Зависимая мера, используемая в контекстуальном и сигнальном формировании условного рефлекса страха, представляет собой реакцию замирания, которая происходит после сочетания безусловного стимула (unconditioned stimulus, US) – удара электрического тока (foot shock) с условным стимулом (conditioned stimulus, CS). Очевидно, что если в контексте обусловленности применять удар электрическим током в сочетании с тоном, то обучение будет происходить не только по тону, но и по контексту.

Оборудование для проведения тестирования представляет собой акриловую квадратную камеру (размер 33x25x28 см) с электрифицированным решетчатым полом, которая помещается в звуконепроницаемую камеру (размер 170x210x200 см), чтобы минимизировать внешние шумы во время тестирования. Подсветка (светодиоды 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).

Данный тест проводится согласно описанной методике в течение трех дней [363].

Создание условий для запоминания и формирование кривой обучения

В первый день создаются условия для запоминания и обучения в данном тесте, проявляющиеся возрастающим времени замирания. Для реализации таких условий для замирания в течение первого дня мышей помещали в новую

для нее камеру. Свободно передвигающаяся мышь исследовала камеру в течение 120 секунд. После этого в качестве условного раздражителя (CS) подавали слуховой сигнал (белый шум, 55 дБ) в течение 30 секунд, а в качестве безусловного стимула (US) в течение последних 2 секунд белого шума подавали ток 0,3 мА. Подачу стимулов CS-US повторяли три раза, чтобы сформировать у животного условный рефлекс страха. В последствии это позволило построить кривую обучения животного. Предъявление такой комбинации стимулов происходила на 120, 240 и 360 секунде после начала теста. Соответственно оценка времени замирания проводилась в интервалах подачи CS-US. После последней пары стимулов животное находилось в испытываемой камере еще 90 секунд, 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.

Контекстуальная обусловленность страха

Контекстуальная обусловленность страха является основной процедурой кондиционирования, т.е. создания условий для замирания. Это включает в себя взятие животного и помещение его в новую среду, предоставление неприятного стимула (электрический ток), а затем его удаление. Когда животное возвращается в ту же среду, оно обычно демонстрирует условный рефлекс страха, проявляющийся реакцией замирания, в том случае, если животное запоминает и связывает эту среду с таким неприятным стимулом. Замирание – это специфическая для вида реакция на страх, которая определяется как «отсутствие движения, за исключением дыхания». Это может длиться от нескольких секунд до минут, в зависимости от силы раздражительного стимула, количества предъявлений и степени обучения.

Контекстуальный 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)).

Условное (вызванное стимулом) выражение страха

Условное (вызванное стимулом) выражение страха аналогично контекстуальному, за одним явным исключением: в новый контекст добавляется CS. В норме животное начинает связывать белый шум (CS) со средой и замирать, хотя данная среда и не является идентичной среде в первый день тестирования.

Для создания таких условий проводят третий день тестирования (сигнальный тест) Тест проводится в новых условиях, при которых происходит смена характера стен и пола, освещенности, тест проводят в течение 360 секунд. Данное испытание делится на два периода – первые 180 секунд испытуемая особь изучает новую обстановку, затем подается белый шум. 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 [3, 276, 363]. Весь процесс тестирования фиксировался с помощью системы видеонализа за животными ANY MAZE (Behavior Tracking Software, Stoelting, USA).

Для оценки отсроченной памяти контекстуальный и сигнальные дни проводят через неделю после создания условий для консолидации памяти.

Тест «Водный лабиринт Морриса». Создание условий для когнитивной стимуляции

Водный лабиринт Морриса (ВЛМ) – это тест пространственного обучения для грызунов, которые, используя для навигации дополнительные сигналы на стенках бассейна (источники света), должны найти скрытую под водой платформу. Пространственное обучение оценивается в ходе повторных испытаний, а память определяется предпочтением той области, в которой должна находиться платформа в случае ее отсутствия. ВЛМ является надежным тестом, позволяющим оценить обучение животных, пространственную навигационную память, тесно связанную с синаптической пластичностью гиппокампа [401]. Также ранее было показано, что водный лабиринт Морриса используется в качестве когнитивной и физической стимуляции и может улучшать или отсрочивать когнитивный дефицит, ассоциированный с болезнью Альцгеймера или старением [430].

Водный лабиринт Морриса представляет собой круглый бассейн диаметром 150 см, заполненный водой на 35 см. Под водой в одном из квадратов бассейна находится скрытая платформа диаметром 15 см, расположенная на 2 см ниже уровня воды. Вода для непрозрачности подкрашивается сухим молоком. Запуск животного осуществляется по сторонам света.

Животных обучали и тестировали в водном лабиринте Морриса согласно стандартного протокола [400].

Протокол выполнения:

Стадия: пространственного обучения (приобретение памяти)

1. Помещают животное в желаемое начальное положение в лабиринте, лицом к стене бассейна. Животное выпускается в воду на уровне воды. Начинают видеофиксацию.

2. Попытку останавливают, когда животное достигает платформы. Для каждой попытки отводится лимит в 2 мин (120 с). Животные, не находящие платформу в течение этого срока, либо помещаются на платформу для запоминания. Интервал между попытками 30 с. Цель оставления животного на платформе - дать ему возможность сориентироваться в своем

положении в пространстве и запомнить положение скрытой платформы относительно окружающих ориентировочных сигналов.

3. Затем помещают животное в бассейн с новой точки и повторяют шаги 1-3. Чаще всего в течение дня животному предоставляют четыре попытки.

4. В последующие дни (3 дня) повторяют обучение в лабиринте. Количество дней, в течение которых можно повторить тестирование, зависит от кривой обучения. При четырех испытаниях в день 4 дня для обучения было достаточно для контрольных крыс.

Стадия долговременной памяти: итоговая попытка

5. Проводится через 24 часа после последней тренировочной попытки. Из бассейна вынимают платформу.

6. Помещают животное в новом начальном положении в бассейне, лицом к стене бассейна - чаще, на 180° от исходного положения платформы. Новую начальную позицию во время итогового испытания используют, чтобы гарантировать, что ее пространственные предпочтения являются отражением памяти о местоположении платформы, а не следствием конкретной траектории плавания.

7. Животное удаляют из теста через 60 с, поскольку существуют доказательства того, что предпочтение квадранта уменьшается после первых 30 с.

Цель итоговой попытки – определить, помнит ли животное, где находилась платформа. Наиболее частым признаком такой памяти является время нахождения в искомом квадрате и число входов в данный квадрат.

Для интерпретации всех полученных результатов были использованы следующие параметры: время нахождения крысы в квадрате со скрытой платформой, число входов в квадрат с платформой, латентное время входа в квадрат с платформой.

Пространственное обучение – создание условий для когнитивной стимуляции

Пространственное обучение (пространственная тренировка, стимуляция) является самой основной процедурой ВЛМ. Идея заключается в том, что животное должно научиться использовать дистальные сигналы для навигации по прямому пути к скрытой платформе при запуске из разных случайных мест по периметру бассейна. Большинство протоколов используют четыре начальных местоположения: N (север), S (юг), E (восток) и W (запад).

Для оценки долговременной памяти в конце обучения дается итоговая попытка. Наиболее распространенным методом является проведение одного пробного исследования через 24 часа после последнего дня тестирования.

Данный тест был использован не только для оценки пространственной памяти, но и для выявления фактора обучения (пространственной тренировки). В данном эксперименте крысы с инъекцией A β 1-42 и контрольные животные с пространственной тренировкой прошли обучение в водном лабиринте Морриса в течение 5 последовательных дней, в каждый из которых они искали скрытую под водой платформу, используя пространственные ориентиры в бассейне, последний день тестирования был без скрытой платформы.

Экспериментальная и контрольная группы без пространственной тренировки также тестировались в ВЛМ в течение 1 дня, но в отсутствие скрытой платформы. Крысы без тренировки позволили нам провести контроль за предполагаемым влиянием стресса и физических нагрузок, а также исключить дефекты моторных и зрительных функций.

2.4. Иммуногистохимическое исследование и конфокальная микроскопия

На 14 день через 30 минут после тестирования в ВЛМ осуществляли транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом (PFA, Sigma-Aldrich, USA) с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10%

нейтральном забуференном формалине, после чего погружали в 20% раствор сахарозы.

С помощью вибратора Thermo Scientific изготавливали саггитальные срезы толщиной 50 мкм. Изучали в срезах зубчатую извилину гиппокампа. В некоторых исследованиях в фокусе также была субвентрикулярная зона и ростральный миграционный путь. Для определения локализации искомым зон использовали стереотаксический атлас головного мозга мышей и крыс.

Изучали экспрессию маркеров методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов. Для блокирования неспецифического связывания срезы головного мозга инкубировали в блокирующем растворе (PBS, содержащем 3% 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. Затем срезы инкубировали с первичными антителами, растворенными в растворе для первичных антител (PBS, содержащем 3% нормальной козьей сыворотки (Sigma), 0,2% Triton X-100 (Sigma) и 0,1% азида натрия (Sigma) в течение ночи при температуре 4°C.

В случае использования антител к BrdU срезы головного мозга были обработаны 2 N HCl при температуре 37°C в течение 1 часа. Затем проводили нейтрализацию кислоты промывкой в растворе 0,1 M бората с двухразовой сменой по 10 минут при комнатной температуре. Далее следовали этапам классической иммуногистохимии.

Для исследования были использованы первичные антитела, представленные в таблице 5 (Таблица 5).

№ блока	Антитела и маркеры	Производитель
I	CD133 – маркер стволовых клеток Nestin – маркер мультипотентных клеток-предшественников Pax6 – маркер базальных прогениторных клеток, PSA-NCAM – маркер нейробластов	Anti-CD133 antibody, Abcam ab16518 Anti-Nestin antibody, Abcam ab6142 Anti-Pax6 antibody, Abcam ab5790 Anti-PSA-NCAM antibody, ThermoFisher Scientific, 14-9118-80 Anti-GFAP antibody, Biolegend, 644701

	<p>GFAP – маркер астроцитов, NLRP3 – маркер NLRP3 инфламмасом Ki67 – маркер пролиферирующих клеток PCNA – маркер пролиферирующих клеток S100beta – маркер протоплазматических астроцитов BrdU – бромдезоксисуридин NeuN – маркер зрелых нейронов Arc – ген раннего реагирования</p>	<p>Anti- NLRP3 antibody, Abcam ab4207 Anti- Ki67 antibody, Abcam ab15580 Anti- PCNA antibody, Abcam ab92552 Anti- S100beta antibody, Abcam ab14849 Anti- BrdU antibody, Merc, B8434 Anti- NeuN antibody, Abcam ab177487 Anti- Arc antibody, Abcam ab118929</p>
II	<p>CD133 – маркер стволовых клеток Nestin – маркер мультипотентных клеток-предшественников PSA-NCAM – маркер нейробластов</p> <p>GFAP – маркер астроцитов NLRP3 – маркер NLRP3 инфламмасом Ki67 – маркер пролиферирующих клеток S100beta – маркер протоплазматических астроцитов BrdU – бромдезоксисуридин NeuN – маркер зрелых нейронов IL1beta – маркер провоспалительного интерлейкина 1 бета HMGB1 – high-mobility group protein B1) — белок группы ядерных негистоновых белков HMG.</p>	<p>Anti-CD133 antibody, Abcam ab16518 Anti-Nestin antibody, Abcam ab6142 Anti-PSA-NCAM antibody, ThermoFisher Scientific, 14-9118-80 Anti-GFAP antibody, Biolegend, 644701 Anti- NLRP3 antibody, Abcam ab4207 Anti- Ki67 antibody, Abcam ab15580 Anti- S100beta antibody, Abcam ab14849 Anti- BrdU antibody, Merc, B8434 Anti- NeuN antibody, Abcam ab177487 Anti- IL1beta antibody, Abcam ab9722 Anti- HMGB1 antibody, Abcam ab18256</p>
IV	<p>GFAP – маркер астроцитов NLRP3 – маркер NLRP3 инфламмасом NeuN – маркер зрелых нейронов</p>	<p>Anti-GFAP antibody, Biolegend, 644701 Anti- NLRP3 antibody, Abcam ab4207 Anti- NeuN antibody, Abcam ab177487</p>
V	<p>Nestin – маркер мультипотентных клеток-предшественников GFAP – маркер астроцитов NLRP3 – маркер NLRP3 инфламмасом Doublecortin (DCX) – маркер мигрирующих нейробластов NeuN – маркер зрелых нейронов NeuroD1 – фактор дифференцировки VEGFR2 – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста</p>	<p>Anti-Nestin antibody, Abcam ab6142 Anti-GFAP antibody, Biolegend, 644701 Anti- NLRP3 antibody, Abcam ab4207 Anti- Doublecortin antibody, Abcam ab18723 Anti- NeuN antibody, Abcam ab177487 Anti- NeuroD1 antibody, Abcam ab177487 Anti- VEGFR2 antibody, Abcam ab2349</p>

VI	Nestin – маркер мультипотентных клеток-предшественников GFAP – маркер астроцитов NLRP3 – маркер NLRP3 инфламмасом IL1beta – маркер провоспалительного интерлейкина 1 бета	Anti-Nestin antibody, Abcam ab6142 Anti-GFAP antibody, Biolegend, 644701 Anti- NLRP3 antibody, Abcam ab4207 Anti- IL1beta antibody, Abcam ab9722
VII	c-fos – ген раннего реагирования CD31 – маркер клеточной адгезии (эндотелиоцитов) JAM – белок межклеточных контактов HMGB1 – high-mobility group protein B1) — белок группы ядерных негистоновых белков HMG.	Anti- c-fos antibody, Abcam ab209794 Anti- CD31 antibody, Abcam ab28364 Anti- JAM1 antibody, Abcam ab180821 Anti- HMGB1 antibody, Abcam ab18256
VIII	Nestin – маркер мультипотентных клеток-предшественников Doublecortin (DCX) – маркер мигрирующих нейробластов MAP-2 – нейрон-специфический цитоскелетный белок	Anti-Nestin antibody, Abcam ab6142 Anti- Doublecortin antibody, Abcam ab18723 Anti- MAP-2 antibody, Abcam ab18723

После инкубации с первичными антителами в течение ночи при температуре 4 °С срезы промывали в PBS и затем инкубировали со 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) и накрывали покровным стеклом [17, 7].

Изображения были сделаны с объективом 60× на конфокальном флуоресцентном микроскопе (Olympus FluoView) и обрабатывались с использованием программного обеспечения Olympus FluoView software (Ver.4.0a). Оценивали пять полей зрения. Результаты представлены как относительное количество иммунопозитивных клеток.

Для определения коэкспрессии в ряде экспериментов был определен коэффициент колокализации или коэффициент перекрытия по Manders.

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 [452].

2.5. Окрашивание бета-амилоида

Для окрашивания включений бета-амилоида использовали краситель Тиофлавин S. Сначала готовили 1% раствор тиофлавина S в дистиллированной воде с последующей фильтрацией. Свободно плавающие срезы гидратируют через серию растворов этилового спирта (100%, 95%, 80%, 70%, 1-2 минуты в каждом), помещая на несколько секунд. После чего промывают в воде и затем окрашивают 1% тиофлавином S в течение 30–60 минут. Затем срезы снова гидратировали с помощью растворов этилового спирта (70%, 80%, 95%, 100%, 100%, 1–2 минуты в каждом) и затем срезы помещали на предметное стекло 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).

2.6. Оценка апоптоза методом TUNEL

С помощью метода TUNEL возможно определить апоптотические клетки за счет детекции разрывов ДНК. При помощи фермента искусственно созданные нуклеотиды помещаются на 3'-ОН концы.

Определение числа клеток в апоптозе выполняли на свободно плавающих срезах головного мозга. В исследовании использовали набор TUNEL “In situ Direct DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Abcam Plc,

United Kingdom). Методику выполняли в соответствии со стандартным протоколом, предложенным в наборе. А именно: срезы головного мозга инкубировали с компонентами реакционной смеси, включающей TdT и FITC- меченые нуклеотиды. Ядра клеток окрашивали пропидий йодидом (ПЙ). При микроскопии регистрировались участки специфической межнуклеосомной фрагментации ДНК, соответствующие местам включения меченых нуклеотидов в цепочку ДНК. Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i. В срезах головного мозга было подсчитано количество FITC- и ПЙ- позитивных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа. Оценивались пять полей зрения.

2.7. Иммуноферментный анализ

Определение уровня лактата

Концентрацию лактата в гомогенатах гиппокампа проводили методом иммуноферментного анализа согласно протоколу, представленному в наборе: L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (ab65330) [137]. Концентрацию лактата определяли колориметрическим методом.

Измерение концентрации белков выполняли 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 лактата в гомогенате представлен в нмоль/мкг белка.

Определение уровня интерлейкина 1 бета (IL-1 β)

Концентрация IL-1 β была определена методом иммуноферментного анализа согласно протоколу, представленному в наборе: IL-1 beta Mouse

ELISA Kit 96 tests (KMC0011). Для исследования использовали гомогенаты гиппокампа.

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. Электрофизиологическое исследование

В электрофизиологических экспериментах использовались коронарные живые срезы головного мозга. Для этого мышь глубоко анестезировалась введением внутривенно хлоралгидрата в концентрации 400мг/кг веса животного. Далее животное декапитировалось, и его мозг помещался на 1 минуту в ледяной (+4°C) раствор искусственной СМЖ (иСМЖ), перфузируемой смесью газов 5%CO₂ и 95% O₂. Состав иСМЖ (в mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 D-глюкоза. Коронарные срезы, находящиеся в ледяной иСМЖ, получались с помощью вибротома Thermo Scientific Microm CU65. Инкубация готовых срезов в иСМЖ, перфузируемой смесью газов 5%CO₂ и 95% O₂, при комнатной температуре проходила в течение часа до начала электрофизиологического эксперимента.

Срез помещался в электрофизиологическую ванночку и омывался во время эксперимента иСМЖ с растворёнными в ней 5% CO₂ и 95% O₂. Регистрация пВПСП производилась с помощью Cl-Ag электрода в стеклянной

боросиликатной пипетке, заполненного иСМЖ. Стимуляция пресинаптических волокон производилась с помощью платино-иридиевого электрода с сопротивлением 5 МΩ. Запись потенциалов и стимуляция производилась с помощью усилителя НЕКА ЕРС10 USB с СА1 и СА3 зон гиппокампа. Данные образования визуально определялись по характерным формам при увеличении объектива x10.

2.9. Выделение и культивирование нейросфер

Источником клеток головного мозга служили мыши в C56Bl/6 возрасте 10-14 суток. Животных декапитировали после охлаждения на льду и производили забор головного мозга. Мозг помещали в ледяной раствор 2% глюкозы в PBS. Выделяли интересующие регионы (гиппокамп, стенки боковых желудочков) и иссекали до размеров 1 мм³. После окончания диссекции, выделенную ткань переносили в свежий раствор 2% глюкозы в PBS (в конической пробирке 14 мл) на 1 минуту. После осаждения ткани удаляли супернатант. Оставшуюся ткань ресуспензировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, USA). Проводили тритурацию (25-30 раз) ткани стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Через 2 минуты, после осаждения неразделенных кусочков ткани собирали супернатант и переносили его в новую стерильную 14 мл пробирку. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 минут, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией.

Подсчет количества клеток осуществляли с помощью цитометра Scepter Cell Counter (Millipore). Полученные клетки в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл сеяли в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл «конечной» среды NeuroCult NS-A Proliferation. Инкубация осуществлялась в условиях инкубатора при 5% CO₂ и 37°C. Через 24-48 часов наблюдали образование нейросфер.

Получение и культивирование астроцитов

Получение культуры астроцитов проводили путем направленной дифференцировки нейросфер в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США). Среда Astrocyte Medium состояла из Basal Medium, FBS (ScienCell, США), AGS (ScienCell, США), P/S solution (ScienCell, США). Через 7-9 дней наблюдали образование монослоя астроцитов.

Для формирования сокультуры нейросфер и астроцитов использовали культуральные планшеты с вставками. Нейросферы засеивались на дно лунки, астроциты – во вставку. Предварительно нейросферы из 3 и 4 опытных групп инкубировались в течение суток в присутствии β -амилоида 1-42 (Sigma-Aldrich, USA) в питательной среде в конечной концентрации 10 мкМ.

2.10. Оптогенетическая стимуляция

2.10.1. Амплификация аденовирусов и трансфекция

Для достижения высокого уровня экспрессии белка ChR2 в астроцитах был использован AVV с сильным промотором GFAP (С. Каспаров, Великобритания). Для амплификации GFAP-ChR2-mKate аденовируса (AVV) использовались НЕК 293. НЕК 293 клетки инкубировались при 37°C и 5% CO₂ в течение 2-3 дней до окончания развития цитопатического эффекта (ЦПЭ). Когда ЦПЭ был завершён, клетки собирались и подвергались сонификации для их разрушения. После дебрис осаждался центрифугированием при 3000g x 10 мин. Очистка AVV производилась с помощью ультрацентрифугирования (Центрифуга Optima X, Beckmann Coulter, США). AVV был аликвотирован по 20 μ l и хранился при -80°C.

После посадки астроцитов в чашку Петри, они были инфицированы GFAP-ChR2-mKate. Концентрация AVV достигала $3,4 \times 10^7$ U/мл. Инфицированные астроциты анализировались ежедневно для наличия mKate флуоресценции которая чаще начиналась через 24 ч после заражения. Для

достижения более выраженного эффекта мы использовали культуры астроцитов спустя 4 дня после заражения.

2.10.2. Фотоактивация астроцитов, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate

Клетки, экспрессирующие GFAP-ChR2-mKate, обнаруживались по аутрофлуоресценции белка mKate. Активация оптогенетической конструкции достигалась при подаче средней интенсивности голубого света от светодиода (480 nm). Стимуляция проводилась короткими импульсами (20 мсек) с последующим перерывом (20 мсек) и продолжалась 60 сек. Активация астроцитов производилась через 4 дня после заражения трижды во временных точках 6 ч, 12 ч и 18 ч.

2.11. Регистрация пролиферативной активности нейросфер

Для оценки нейротоксического влияния амилоида, а также фотоактивированных астроцитов на пролиферативный потенциал нейросфер (стволовых и прогениторных клеток) использовали систему для проведения анализа пролиферативной активности клеток «xCelligence» (Roche, Швейцария). Использовались специальные 16-ти луночные планшеты E-plate и вставки к ним (E-plate insert).

Принцип методики определения клеточного индекса заключается в том, что присутствие клеток на электродах в лунках планшета вызывает изменения ионного состояния, что приводит к изменению сопротивления. Электроды в лунках планшета регистрируют эти изменения, а специализированное программное обеспечение рассчитывает показатель клеточного индекса. С увеличением количества клеток в лунках планшета наблюдается увеличение клеточного индекса, который является расчетным показателем. Собственно клеточный индекс или индекс клеточной пролиферации зависит от количества, размеров клеток и является импедансозависимым.

Нейросферы помещали в планшеты анализатора ($1,3 \cdot 10^4$ клеток в каждой лунке). Астроциты вносили в специальные вставки для планшет ($1 \cdot 10^4$ клеток в каждой лунке), для исключения их физического контакта с электродами анализатора. Вставки с астроцитами помещали внутрь лунок планшет. Таким образом, непосредственный контакт электродов был только с нейросферами.

Регистрация и изучение особенностей пролиферативной активности клеток осуществлялась с использованием системы «xCELLigence», предназначенной для анализа пролиферации клеток в режиме реального времени (Roche, Швейцария).

Регистрация пролиферативной активности осуществлялась в течение 48 часов: первые 4 часа регистрация проводилась каждые 5 минут, с 4 часов до 12 часов – каждые 15 минут, с 12 часов до 24 часов – каждые 30 минут, с 24 часов до 48 часов – каждые 60 минут.

Далее клетки культивировали в среде DMEM с FBS, гепарином, bFGF, EGF, ECGS в инкубаторе при 37°C с 5% CO_2 с регистрацией клеточного индекса каждые 15 минут в течение 72 часов.

2.12. Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики с использованием программы GraphPad Prism7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). 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 несоблюдении условий нормальности распределения сравнение двух групп осуществляли с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни", для сравнения больше, чем двух групп использовали критерий Краскелла-Уоллиса.

Для оценки влияния двух факторов применяли двухфакторный ANOVA (two-way ANOVA): применялся двухфакторный дисперсионный анализ независимых выборок, двухфакторный дисперсионный анализ повторных измерений, а также трехфакторный параметрический дисперсионный анализ и непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса). Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью *post-hoc* Sidak's теста множественных сравнений, критерий Тьюки, Данна.

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 исследований влияния пространственной тренировки и введения растворимых олигомеров на процессы обучения, запоминания, нейрогенеза, нейровоспаления

В данном эксперименте крысы с инъекцией A β 1-42 и контрольные животные с пространственной тренировкой прошли обучение в водном лабиринте Морриса в течение 5 последовательных дней, в каждый из которых они искали скрытую под водой платформу, используя пространственные ориентиры в бассейне, последний день тестирования был без скрытой платформы. Экспериментальная и контрольная группы без пространственной тренировки также тестировались в ВЛМ в течение 1 дня, но в отсутствие скрытой платформы. Крысы без тренировки позволили нам провести контроль за предполагаемым влиянием стресса и физических нагрузок, а также исключить дефекты моторных и зрительных функций.

Пространственная тренировка способствует интенсификации ранних этапов нейрогенеза у крыс с инъекцией A β 1-42

В данной части эксперимента у крыс определяли экспрессию маркеров ранних этапов нейрогенеза в субгранулярной и гранулярной зонах гиппокампа. Мы оценили экспрессию маркера CD133, Nestin и Pax6. CD133, было показано ранее, экспрессируется как в кроветворных, так и в нейропоэтических клетках. CD133-позитивные клетки способны к инициации образования нейросфер, самообновлению и многолинейной дифференцировке на уровне отдельных клеток. В связи с этим CD133 используется для идентификации нейрональных стволовых клеток, а именно он маркирует плюрипотентные стволовые клетки, в то время как Nestin является маркером мультипотентных клеток-предшественников [432].

Тренировка в водном лабиринте Морриса приводит к увеличению количества CD133+ клеток-предшественниц у крыс с инъекцией A β 1-42. Мы обнаружили статистически значимое влияние фактора когнитивной тренировки в исследуемых группах ($F(1,24) = 5,977$, $p=0,0222$, двухфакторный ANOVA). При множественном сравнении выявлено, что количество CD133-иммунопозитивных клеток статистически значимо больше и составляет $9,0 \pm 2,24$ у тренированных и $4,9 \pm 0,6$ в поле зрения у нетренированных A β 1-42-инъектированных крыс ($p=0,0241$, Tukey's критерий) (Рисунок 16А, Б).

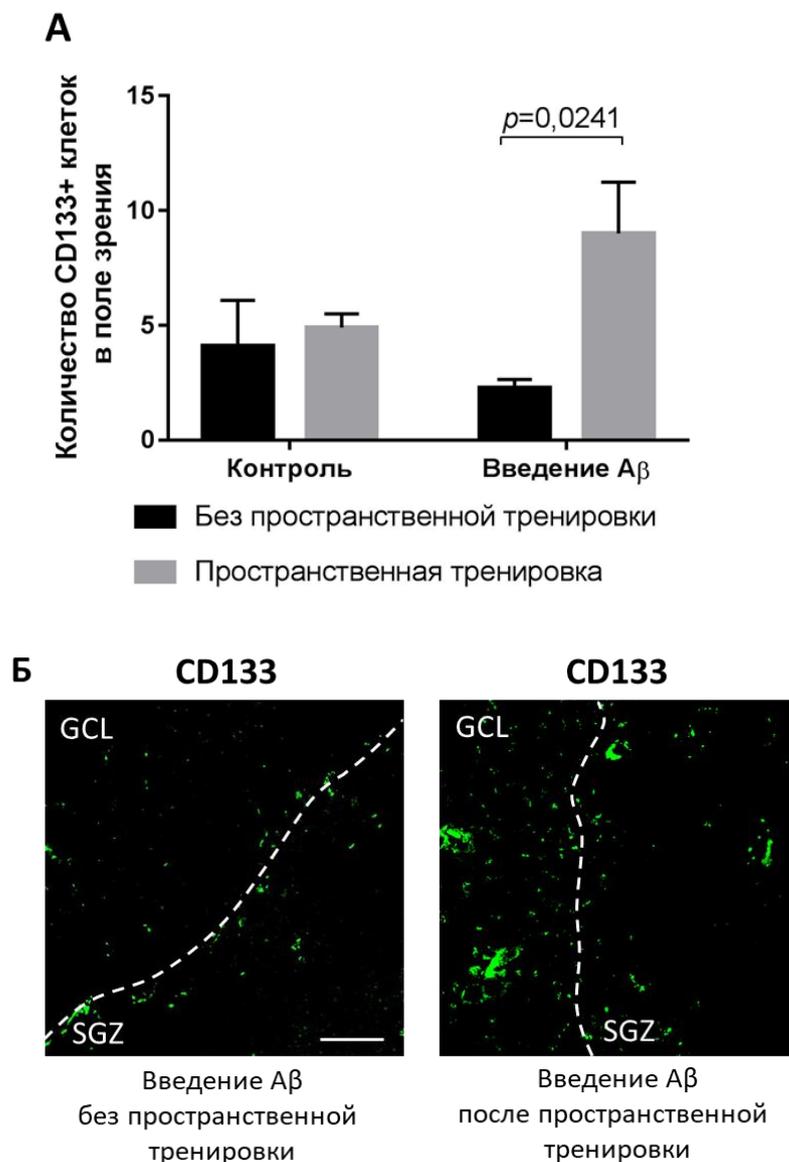
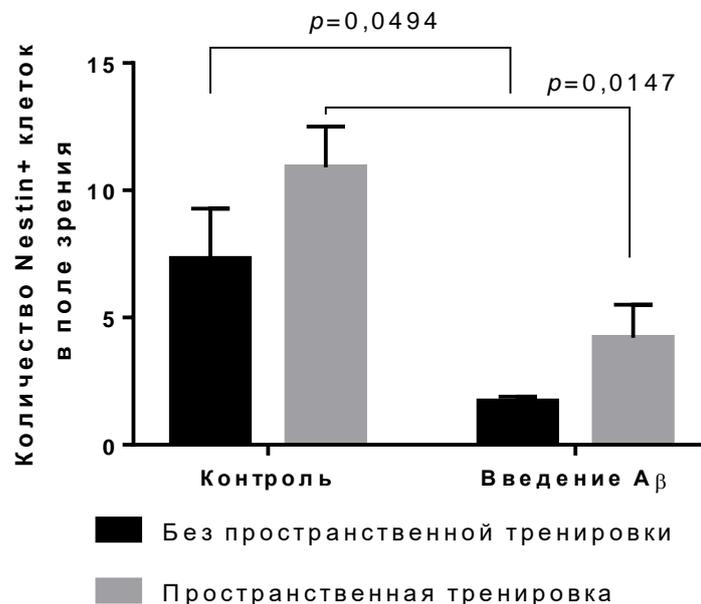


Рисунок 16 – (А) Количество CD133+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировкой. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия CD133 в зубчатой извилине гиппокампа. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Далее был определен маркер мультипотентных клеток-предшественников Nestin в нейрогенной нише. Было выявлено, что на число клеток, экспрессирующих Nestin, влияет моделирование болезни Альцгеймера $F(1,24) = 18,43$, $p=0,0003$, двухфакторный дисперсионный анализа), а также оказывает влияние и когнитивная стимуляция $F(1,24) = 4,532$, $p=0,0437$, значимого влияния взаимодействия двух факторов не выявлено. При множественном сравнении показано, что количество мультипотентных нейрональных предшественников статистически значимо больше в группе ложно-оперированного контроля ($7,3 \pm 1,98$), чем при введении $A\beta_{1-42}$ ($1,7 \pm 0,2$) ($p=0,0494$, Tukey's критерий). Аналогичные данные были получены и при сравнении этих двух групп, но после когнитивной стимуляции в ВЛМ ($p=0,0147$, Tukey's критерий). При этом при сравнении экспериментальной группы без тренировки и после тренировки также отмечено увеличение число Nestin+ клеток, однако данное отличие не было статистически достоверным ($p=0,6121$, Tukey's критерий) (Рисунок 17).



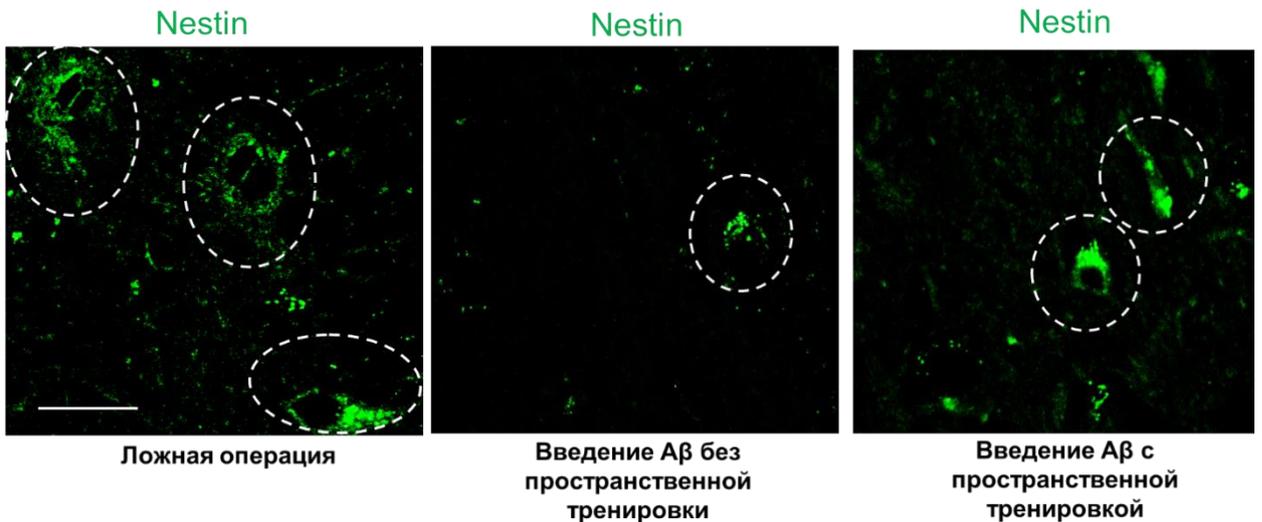


Рисунок 17 – (А) Количество Nestin+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировкой. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ –внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия Nestin в зубчатой извилине гиппокампа. Масштабная шкала – 50мкм.

Следующим маркером в хронологии нейрогенеза ранних этапов взрослого нейрогенеза часто выступает Рах6 [442]. Рах6 является ключевым регулятором определения судьбы нейронов, а также маркером пролиферации нейрональных стволовых клеток [411]. Количество промежуточных Рах6+ прогениторных клеток, известных как базальные прогениторные клетки, статистически значимо не изменилось у тренированных и нетренированных крыс исследуемых групп: не было значимого влияния взаимосвязи двух факторов – тренировки и операции ($F(1,24) = 2,398, p=0,1346$, двухфакторный ANOVA) (Рисунок 18).

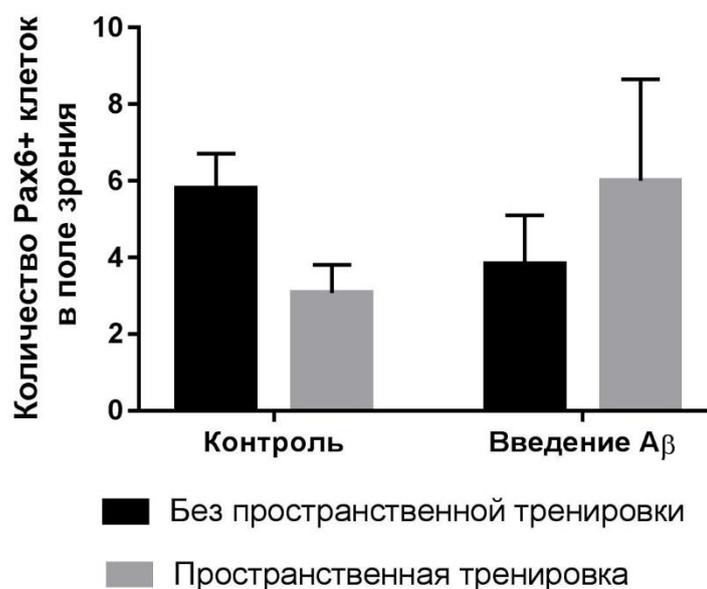


Рисунок 18 – Количество Pax6+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Пространственная тренировка способствует пролиферации НСК в субгранулярной зоне зубчатой извилины в здоровом головном мозге, но не при нейродегенерации

При изучении пролиферирующих клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины выявили статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (*типа операции* и *когнитивной тренировки*) ($F(1,24) = 10,76$, $p=0,0032$). При множественном сравнении установлено, что когнитивная стимуляция способствует увеличению пролиферирующих клеток в СГЗ в группе контроля ($10,83 \pm 0,65$) по сравнению с животными без обучения ($7,42 \pm 1,30$) ($p=0,0458$, Tukey's критерий). При этом пространственная стимуляция не влияет на экспрессию маркера Ki67 в субгранулярной зоне зубчатой извилины при моделировании нейродегенерации ($2,00 \pm 0,89$) по сравнению с группой без обучения ($4,24 \pm 0,25$) ($p=0,28046$ Tukey's критерий) (Рисунок 19). Следует особо отметить, что Ki67 представляет собой ядерный белок, который можно использовать в качестве маркера для делящихся клеток.

Он обнаруживается во всех временных фазах клеточного цикла, кроме фаз G0 и ранней фазы G1, и то же самое относится к покоящимся клеткам [441].

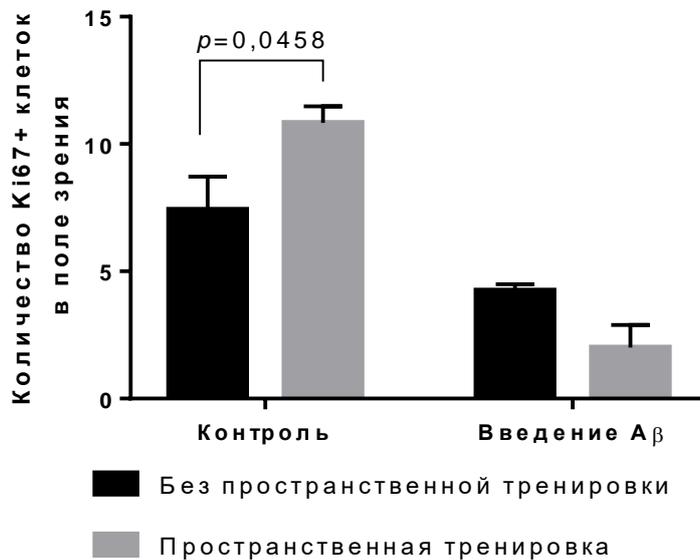


Рисунок 19 – Количество Ki67+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Вместе с тем имеется еще один маркер активно пролиферирующих клеток – PCNA, ядерный антиген пролиферирующих клеток, который важен как для репарации, так и для репликации ДНК. Экспрессия PCNA увеличивается во время фаз G1 и S и уменьшается при превращении клетки в фазы G2 и M. Тем не менее, этот маркер также может быть обнаружен в ранней фазе G0, что обусловлено длительным периодом полураспада от восьми до двадцати часов. Следовательно, это относится к тому факту, что PCNA экспрессируется во всем процессе клеточного цикла. Как маркер пролиферации, он обычно применяется для маркировки подгруппы активно делящихся клеток, что является индикатором пролиферирующих нейрональных стволовых клеток (PCNA-позитивных клеток) в SVZ, SGZ [441]. Согласно вышеупомянутому исследованию, и PCNA, и Ki-67 могут использоваться для маркировки делящихся клеток, но PCNA является более широким, чем Ki67.

В данном исследовании была определена и экспрессия PCNA+ клеток в СГЗ. Выявлено статистически значимое влияние *типа операции* (A β или PBS) ($F(1,24) = 27,28, p < 0,0001$), а также влияние когнитивного тренинга ($F(1,24) = 7,201, p = 0,0130$). Множественное сравнение экспрессии маркера PCNA в зависимости от обучения не выявило статистически значимого изменения PCNA+ клеток в субгранулярной зоне при нейродегенерации после обучения ($3,50 \pm 0,85$) по сравнению с животными без тренировок ($2,25 \pm 0,99$) ($p = 0,7394$, Tukey's критерий) (Рисунок 20). Таким образом, не происходит изменения уровня пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа при моделировании нейродегенерации со стимуляцией когнитивной функции и без нее. Вместе с тем, на здоровый мозг обучение оказывает положительное влияние, проявляющееся увеличением экспрессии пролиферирующих клеток ($p = 0,0483$, Tukey's критерий).

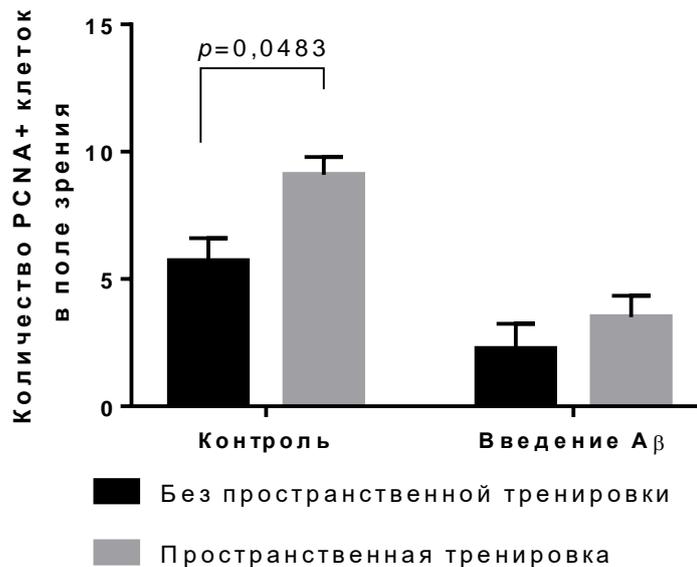


Рисунок 20 – Количество PCNA+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Пространственная тренировка способствует преимущественной дифференцировке клеток по нейрональному пути у крыс с инъекцией A β 1-

В качестве маркера нейробластов оценивали PSA-NCAM иммунопозитивные клетки. Экспрессия PSA-NCAM соответствует конкретным промежуткам нейрогенеза, в которых нейрональные предшественники мигрируют, и начинают приобретать нейрональные свойства, т.е. соответствуют фазе мигрирующих нейробластов [442]. Нами было выявлено статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (пространственного тренинга в водном лабиринте Морриса и операции) в исследуемых группах ($F(1,24) = 7,598, p=0,0110$, двухфакторный ANOVA). При множественном сравнении выявили, что в группе крыс с введением олигомеров $A\beta_{1-42}$ и пространственного тренинга количество PSA-NCAM-иммунопозитивных клеток было статистически значимо больше ($5,24 \pm 0,25$) по сравнению с нетренированными крысами ($2,23 \pm 1,05$) ($p=0,0247$, Tukey's критерий) (Рисунок 21).

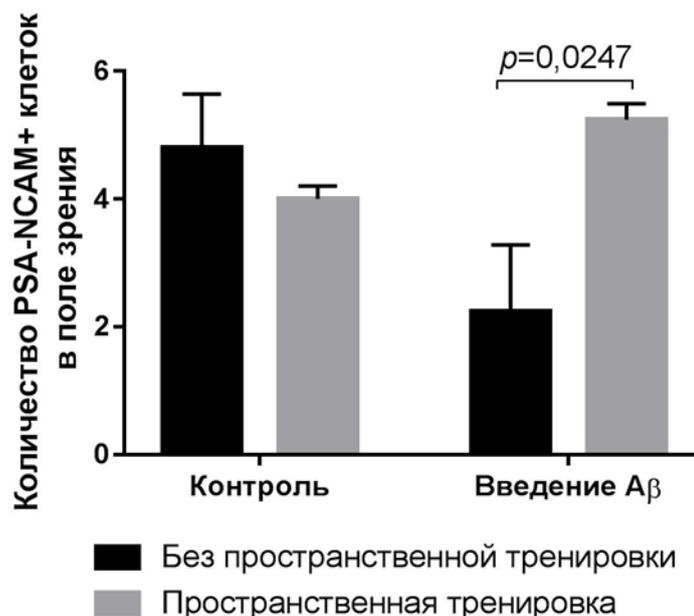


Рисунок 21 – Количество PSA-NCAM+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировкой. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение $A\beta$ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Также мы определили экспрессию клеток астроглиальной природы в нейрогенной нише исследуемых групп. Выявлено статистически значимое влияние когнитивной тренировки на экспрессию GFAP-иммунопозитивных

клеток ($F(1,24) = 22,76, p < 0,0001$, двухфакторный ANOVA). При множественном попарном сравнении с использованием Tukey's критерия выявлены статистически значимые различия в экспрессии GFAP+ клеток. В группе с инъекцией A β 1-42 с пространственной тренировкой количество GFAP-иммунопозитивных астроцитов составило $3,2 \pm 1,22$ по сравнению с нетренированными крысами с аналогичной инъекцией растворимой формы бета-амилоида - $6,5 \pm 0,99$ ($p = 0,0063$, Tukey's критерий). Аналогичные изменения были зафиксированы в группе ложно-оперированных животных. Так у крыс после тренировки количество астроцитов, экспрессирующих GFAP было ниже ($1,82 \pm 0,32$) по сравнению с крысами без тренировки ($6,5 \pm 0,43$) ($p = 0,0029$, Tukey's критерий) (Рисунок 22).

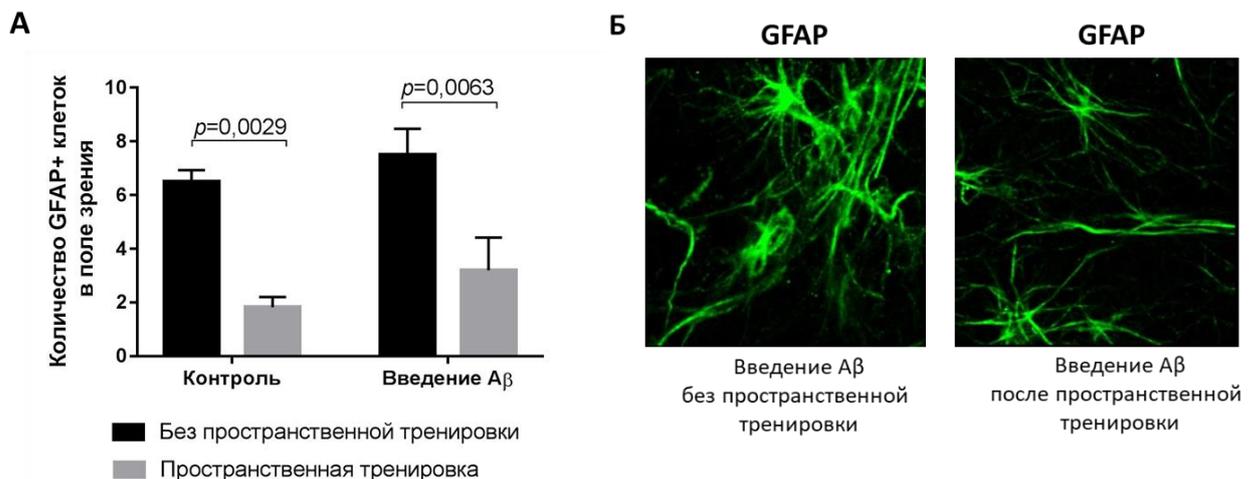


Рисунок 22 – (А) Количество GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировкой. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия GFAP в зубчатой извилине гиппокампа.

Кроме того, в исследовании была определена экспрессия маркера S100beta. Известно, что s100beta и GFAP маркируют собой гетерогенные популяции астроцитов, в частности, s100beta экспрессируют преимущественно астроциты, входящие в состав нейроваскулярной единицы головного мозга (т.н. протоплазматические астроциты), тогда как GFAP – зрелые клетки, не участвующие в работе нейроваскулярной единицы, а также радиальная глия. Выявлено статистически значимое влияние типа операции на

экспрессию S100beta: ($F(1,24) = 59,87, p < 0,0001$), а также значимое влияние когнитивной тренировки ($F(1,24) = 4,391, p = 0,0468$). Множественное сравнение показало, что на экспрессию данного маркера у ложно-оперированных животных когнитивная тренировка влияния не оказывает ($p = 0,9552$, Tukey's критерий). У крыс с моделированием БА экспрессия S100beta была значимо выше ($15,3 \pm 0,28$) в сравнении с ложно-оперированным контролем ($4 \pm 1,65$) ($p < 0,0001$) (Рисунок 23). Пространственная тренировка в ВЛМ вызывает снижение числа S100beta+ клеток, однако такое различие было не значимым ($p = 0,0943$).

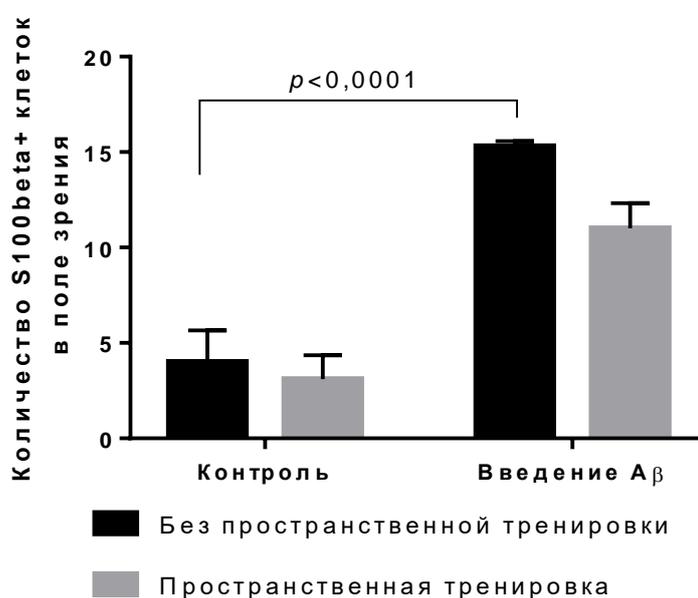


Рисунок 23– Количество S100beta+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Пространственная тренировка способствует миграции нейробластов из субвентрикулярной зоны к ольфакторным луковицам по ростральному миграционному пути при нейродегенерации

При изучении мигрирующих нейробластов при нейродегенерации у крыс с тренировкой памяти выявили значимое влияние введения олигомеров бета-амилоида ($F(1,24) = 9,625, p = 0,0049$), значимое влияние когнитивной тренировки в ВЛМ ($F(1,24) = 6,443, p = 0,0180$), а также статистически

значимое влияние взаимодействия двух факторов (*типа операции и пространственной тренировки*) $F(1,24) = 8,296, p=0,0082$). При множественном сравнении с помощью критерия Tukey's выявили статистически значимое увеличение количества BrdU+/P-NCAM+ клеток после когнитивной стимуляции в группе с введением A β 1-42 ($3,67 \pm 0,88$) по сравнению с нетренированными крысами ($0,50 \pm 0,29$) ($p=0,0042$) (Рисунок 24). На ложно-оперированных животных стимуляция когнитивных функций такого влияния не оказывает. В контрольной группе после тренировок количество мигрирующих нейробластов составило $3,80 \pm 0,52$, что практически не отличается от группы без обучения $4,00 \pm 0,49$ ($p=0,9949$). Таким образом, когнитивная стимуляция у животных с нейродегенерацией способствует миграции клеток-предшественников по ростральному пути.

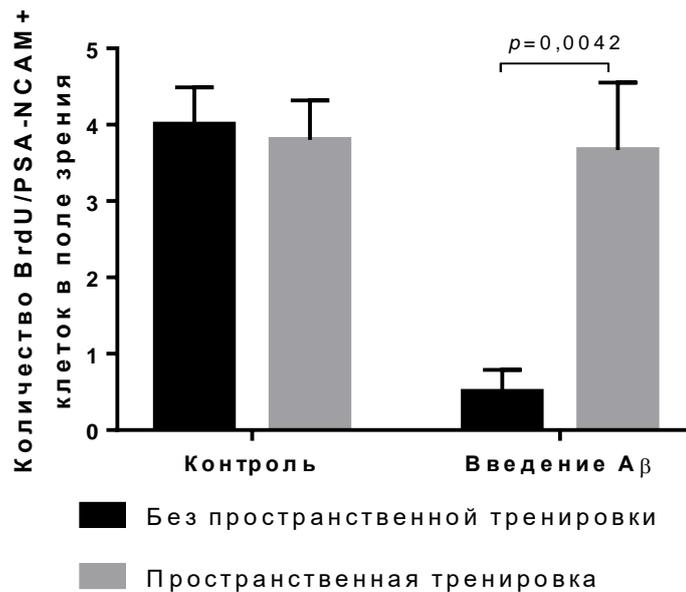


Рисунок 24 – Количество BrdU/PSA-NCAM+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Пространственная тренировка не влияет на выживаемость вновь образованных нейронов

При изучении выживаемости зрелых гранулярных нейронов в зубчатой извилине гиппокампа не было выявлено статистически значимого влияния

операции с введением A β 1-42 ($F(1,24) = 0,8767, p=0,3584$), а также когнитивного тренинга в ВЛМ ($F(1,24) = 0,2192, p=0,6439$). В субгранулярном слое зубчатой извилины количество BrdU+/NeuN+ клеток при проведении ложной операции с когнитивной стимуляцией $0,75 \pm 0,37$ и без нее $1,44 \pm 0,38$ ($p=0,7547$, Tukey's критерий) и при моделировании нейродегенерации с пространственной тренировкой и без нее ($1,67 \pm 0,21$ и $1,44 \pm 0,38$, соответственно) ($p=0,9872$, Tukey's критерий). Это свидетельствует о том, что на выживаемость зрелых нейронов как при моделировании нейродегенерации, так и в контрольной группе тренировки в ВЛМ значимого влияния не оказывают (Рисунок 25).

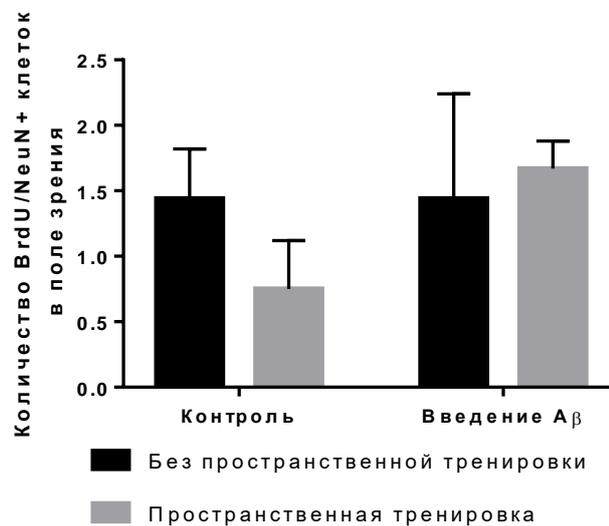


Рисунок 25 – Количество BrdU/NeuN+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировкой. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Таким образом, суммируя вышеописанное можно заключить, что пространственная тренировка способствует интенсификации ранних этапов нейрогенеза у крыс с моделированием нейродегенерации, преимущественной дифференцировке клеток по нейрональному пути, миграции нейробластов из субвентрикулярной зоны к ольфакторным луковицам по ростральному миграционному пути при нейродегенерации, но не влияет на выживаемость вновь образованных нейронов.

Гиппокампальная экспрессии Arc/Arg3.1 после однодневного тестирования и многодневной тренировки различается в здоровом головном мозге

В данном исследовании был проанализирован паттерн экспрессии гена раннего реагирования Arc/Arg3.1 для групп, выполняющих задачу впервые и уже имеющей опыт.

Используя парадигму обучения с одним испытанием в этом исследовании, было продемонстрировано, что само обучение является достаточным для того, чтобы вызвать усиление экспрессии Arc/Arg 3.1 в зубчатой извилине гиппокампа в здоровом головном мозге.

В группе животных с моделированием болезни Альцгеймера отличий в экспрессии Arc выявлено не было.

Выявили статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (типа операции и когнитивной тренировки) ($F(1,24) = 6,716$, $p=0,0160$), а также влияние каждого фактора в отдельности – типа операции (A β или PBS) ($F(1,24) = 19,98$, $p=0,0002$), когнитивной тренировки ($F(1,24) = 4,298$, $p=0,0491$). При множественном сравнении определили статистически значимые различия в группе контроля без пространственной тренировки (однодневное тестирование) и в группе после пятидневной когнитивной стимуляции: увеличение экспрессии Arc после одного дня тестирования в ВЛМ ($p=0,0149$, Tukey's критерий). Также были значимые отличия в группах без продолжительного когнитивного тренинга: выше экспрессия Arc в группе ложного контроля ($13,2 \pm 2,4$), чем после введения олигомеров бета-амилоида ($2,3 \pm 0,8$) ($p=0,0002$, Tukey's критерий) (Рисунок 26).

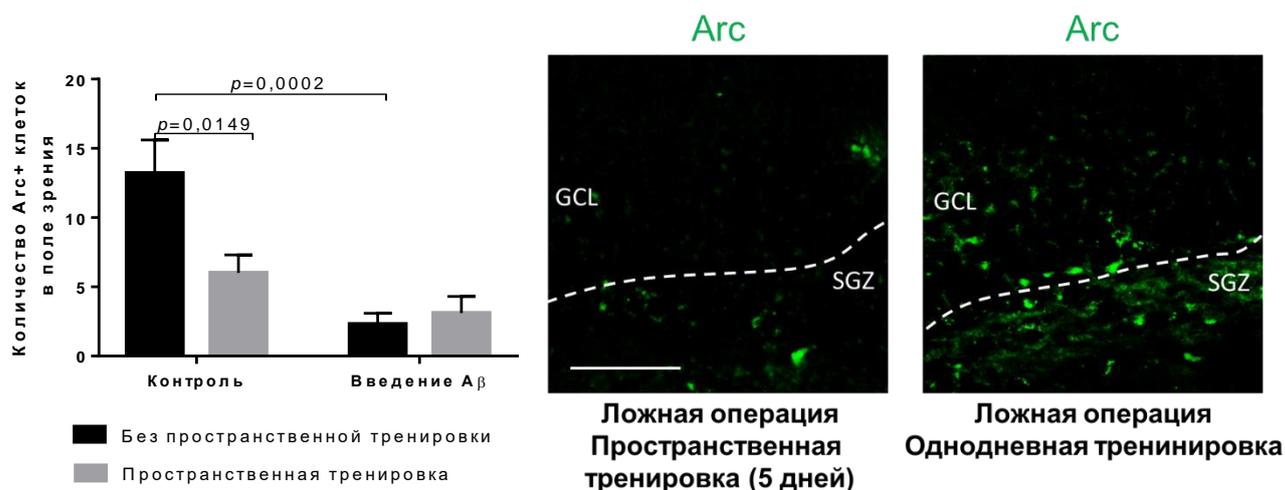


Рисунок 26 – (А) Количество Arc+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия Arc в зубчатой извилине гиппокампа. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Поскольку известно, что стратегии, используемые для эффективного выполнения задания, меняются в зависимости от практики и опыта, в связи с этим, возможна разница в экспрессии гена раннего реагирования. Во время пространственной навигации, с относительно небольшим этапом обучения, выполнение такой задачи, как правило, является более сложным и требует повышенного внимания, позволяя человеку определить местоположение цели, полагаясь на пространственные ориентиры. Такая стратегия, безусловно, требует интактного гиппокампа. С повторением задачи, производительность становится автоматической; та же цель достигается с помощью фиксированного ответа или последовательности действий [129].

Пространственная тренировка приводит к разнонаправленному изменению экспрессии инфламмасом в здоровом и патологичном мозге.

В данной серии экспериментов мы определили в клетках на разных этапах нейрогенеза и астроцитах экспрессию NLRP3 и ее изменение после пространственной тренировки в здоровом мозге (контрольные животные) и у крыс, после инъекции растворимых форм Aβ.

Так на ранних этапах нейрогенеза при оценке экспрессии инфламмасом в стволовых CD133+ клетках выявили значимое влияние взаимодействия двух факторов (пространственной тренировки и введения Аβ) ($F(1,24) = 5,226$, $p=0,0314$, двухфакторный ANOVA), а также значимое влияние пространственной тренировки ($F(1,24) = 5,353$, $p=0,0296$, двухфакторный ANOVA). При множественном сравнении не выявили значимых различий в экспрессии NLRP3/CD133+ клеток в группах с введением Аβ с наличием или без тренировки в водном лабиринте Морриса. Однако, весьма интересная находка обнаружена при попарном сравнении животных контрольной группы с пространственным тренингом и без него: статистически значимое увеличение экспрессии инфламмасом на CD133-иммунопозитивных клетках после тренировки в ВЛМ ($p=0,0166$, Tukey's критерий) (Рисунок 27).

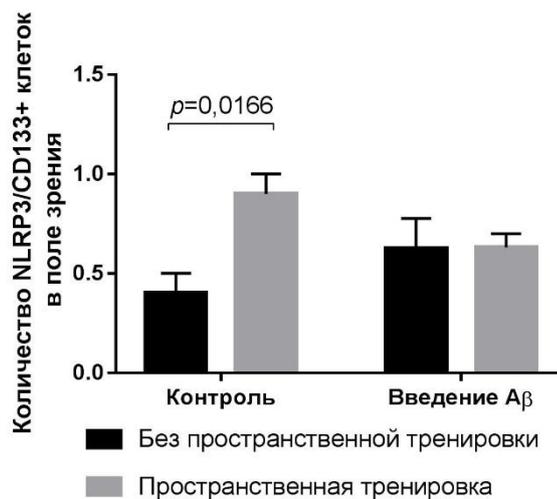
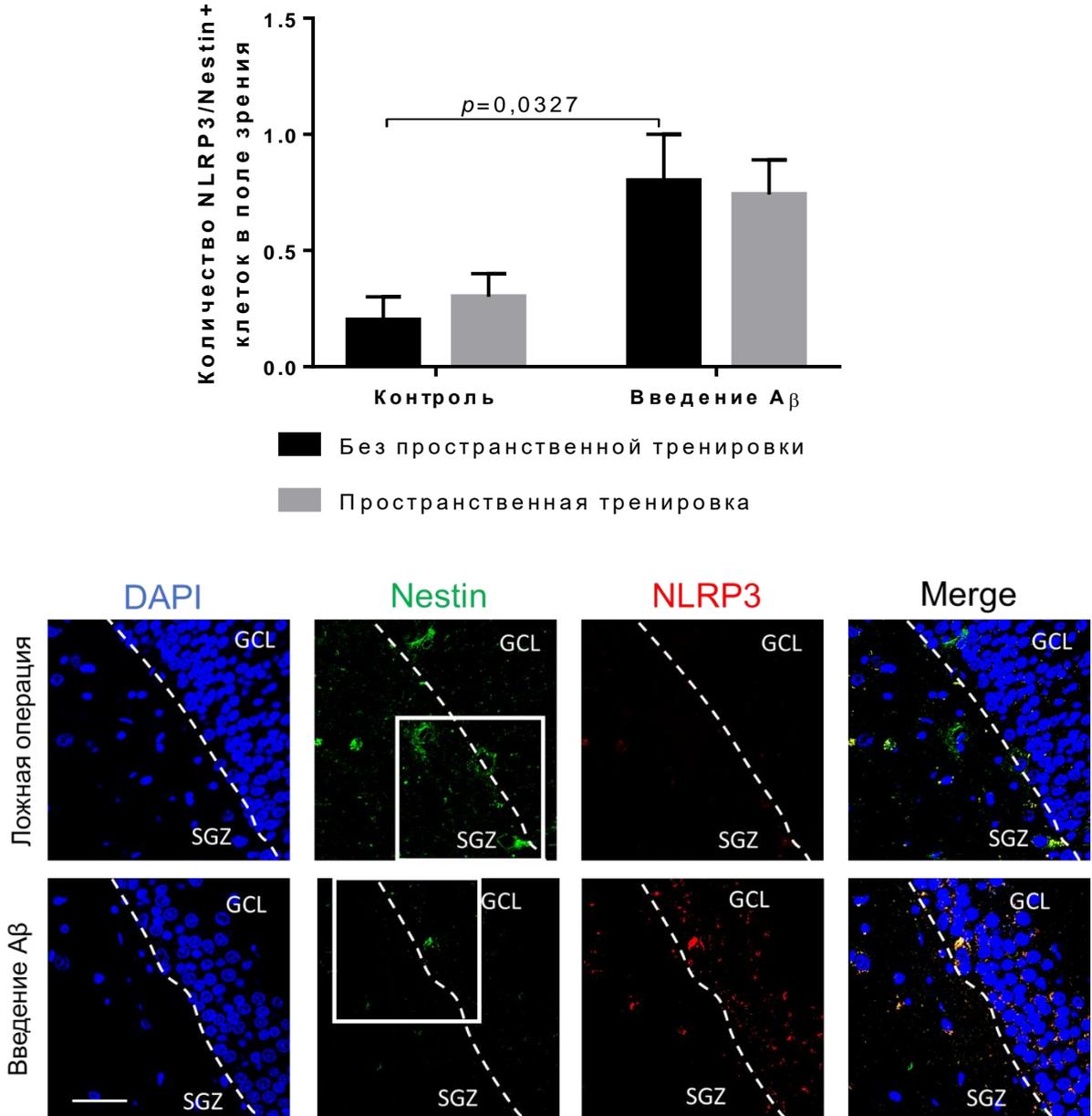


Рисунок 27 – (А) Количество NLRP3/CD133+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

В мультипотентных клетках предшественниках, экспрессирующих Nestin, определили колокализацию с инфламмасомами NLRP3. Статистически значимое влияние имеет тип проводимой операции $F(1,24) = 13,11$, $p=0,0014$. А именно при множественном сравнении выявлено, что колокализация маркеров Nestin/NLRP3 была выше в группе после инъекции бета-амилоида ($0,8 \pm 0,2$), чем в группе ложно-оперированных мышей ($0,2 \pm 0,1$) ($p=0,0327$).

Пространственная тренировка влияния не оказывает на изменение экспрессии инфламмасом в сравниваемых группах $F(1,24) = 0,01939$, $p=0,8904$ (Рисунок 28).



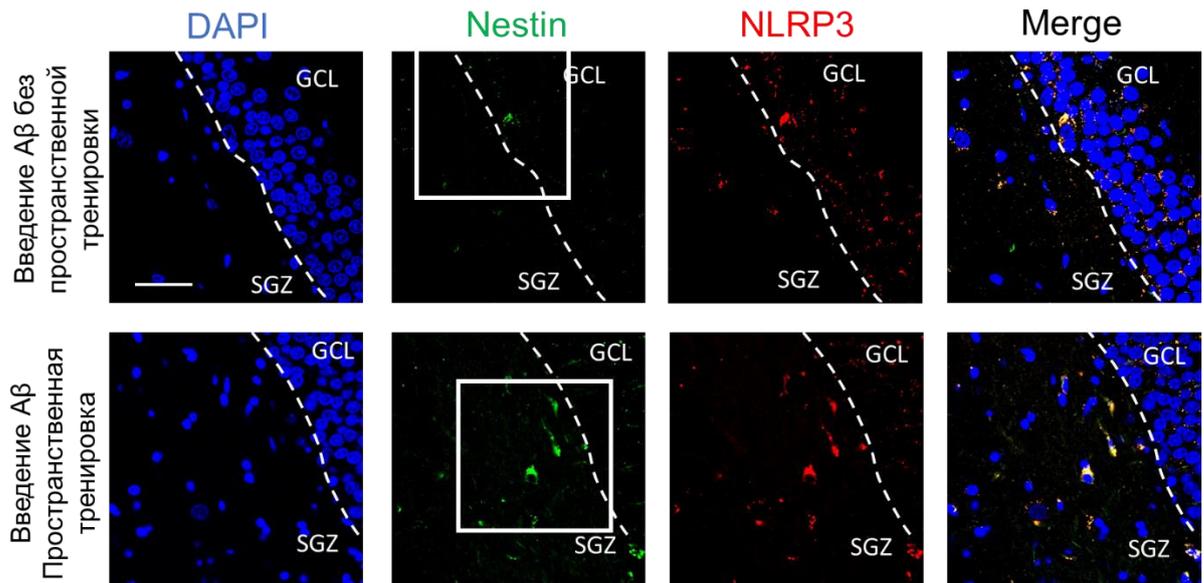


Рисунок 28 – (А) Количество NLRP3/Nestin⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах без тренировки после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия Nestin (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после введения бета-амилоида с и без пространственной тренировки: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия Nestin (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

В базальных прогениторных клетках, экспрессирующих Pax6, не было выявлено значимых различий между группами животных с пространственной тренировкой и без нее у крыс с моделированием болезни Альцгеймера и контрольными животными ($F(1,24) = 0,04$, $p=0,8431$, двухфакторный ANOVA) (Рисунок 29).

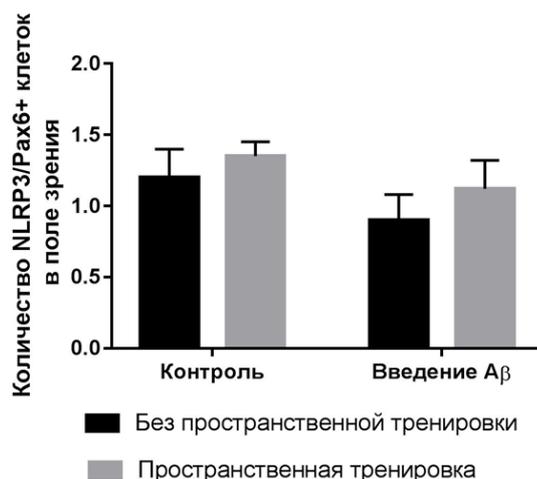


Рисунок 29 – Количество NLRP3/Raх6+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

В PSA-NCAM+ нейробластах также определена экспрессия NLRP3 инфламмасом. Мы выявили статистически достоверное влияние взаимодействия двух факторов (*Пространственной тренировки* и *Операции*) на экспрессию инфламмасом в нейробластах в исследуемых группах ($F(1,24) = 68,18, p < 0,0001$, двухфакторный ANOVA). При множественном попарном сравнении статистически значимые различия обнаружены в группах без пространственной тренировки: с введением Aβ значимо меньше ($0,09 \pm 0,09$), по сравнению с крысами с проведением ложной операции ($0,82 \pm 0,11$) ($p = 0,0294$, Tukey's критерий) (Рисунок 30).

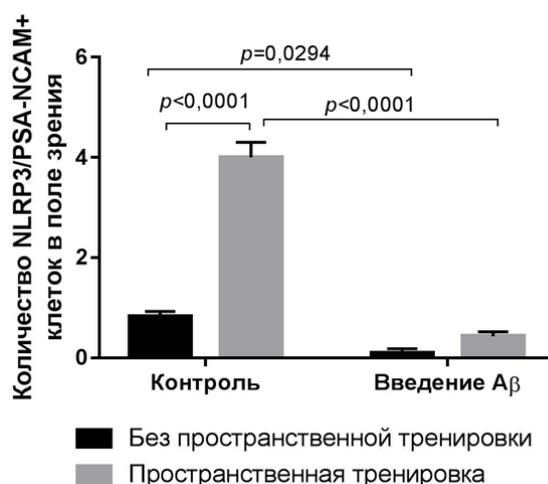


Рисунок 30 – Количество NLRP3/PSA-NCAM+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Интересным наблюдением является то, что у животных после проведения ложной операции и пространственного обучения в водном лабиринте Морриса статистически значимо увеличивается экспрессия PSA-NCAM/NLRP3+ клеток к общему числу нейробластов ($4\pm 0,3$) по сравнению с нетренированными крысами ($0,82\pm 0,11$) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий), иными словами пространственная тренировка приводит к увеличению экспрессии инфламмасом NLRP3 типа в нейробластах в здоровом мозге (Рисунок 31). Следует также отметить, что в группах с тренировкой также обнаружены статистически значимые различия между животными после инъекции $A\beta$ ($0,43\pm 0,09$) и в группе с проведением ложной операции ($4\pm 0,3$) число PSA-NCAM/NLRP3+ клеток к общему числу нейробластов ($p < 0,0001$, Tukey's критерий).

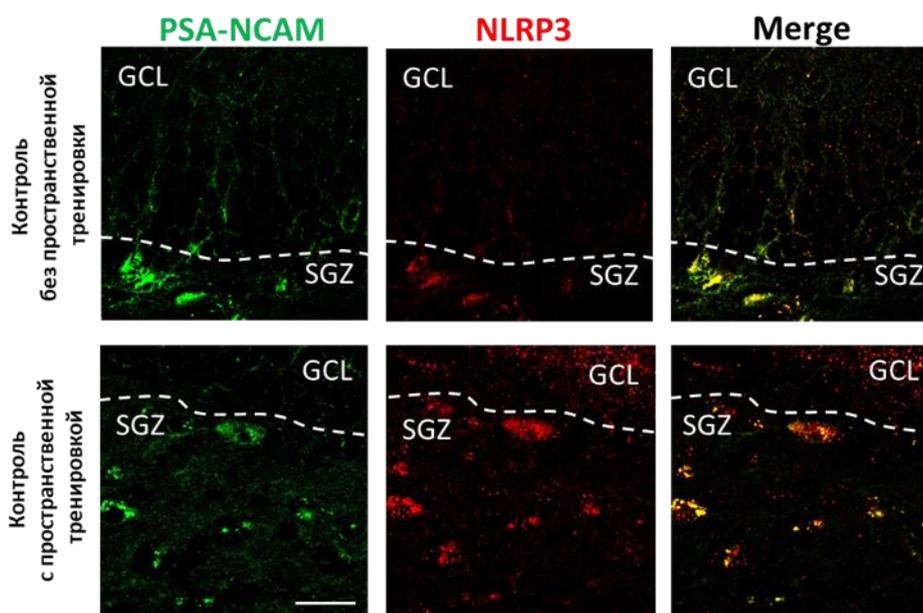


Рисунок 31 – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в контроле после введения PBS с и без пространственной тренировки: в первой колонке – экспрессия PSA-NCAM (зеленый), во второй колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Таким образом, оценивая экспрессию NLRP3 инфламмасом на разных этапах нейрогенеза в головном мозге выявлены следующие закономерности: увеличение экспрессии инфламмасом после тренировки в плюрипотентных стволовых клетках и нейробластах в здоровом головном мозге. Инъекция бета-

амилоида вызывает увеличение экспрессии NLRP3⁺ клеток вне зависимости от длительности исполнения задания в ВЛМ.

При оценке экспрессии NLRP3 инфламмасом в GFAP-иммунопозитивных астроцитах было зафиксировано значимое влияние взаимодействия двух факторов (пространственной тренировки в ВЛМ и операции) ($F(1,24) = 5,804$, $p=0,024$, двухфакторный ANOVA). При множественном попарном сравнении между группами с использованием критерия Tukey's различий выявлено не было (Рисунок 32).

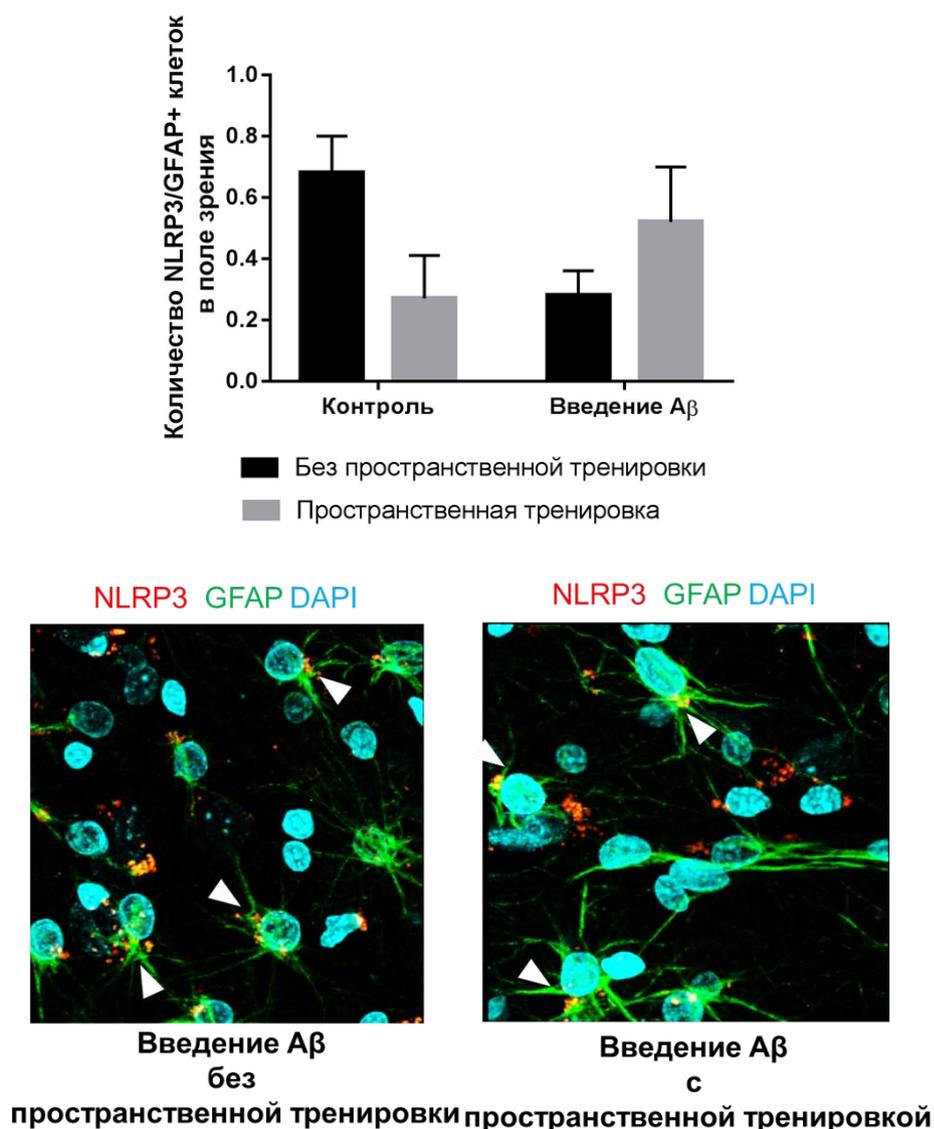


Рисунок 32 – (А) Количество NLRP3/GFAP⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после введения бета-амилоида с и без пространственной тренировки. Наложение сигналов: ядра клеток прокрашены DAPI (синий), экспрессия GFAP (зеленый), экспрессия NLRP3 (красный).

Исследуя колокализацию маркеров S100beta и NLRP3, не было выявлено статистически значимых различий между группами ложно-оперированных и экспериментальных животных с инъекцией бета-олигомеров с разной степенью тренировок в ВЛМ: влияния взаимодействия этих двух факторов ($F(1,24) = 0,05207$, $p=0,8214$, двухфакторный дисперсионный анализ) (Рисунок 33).

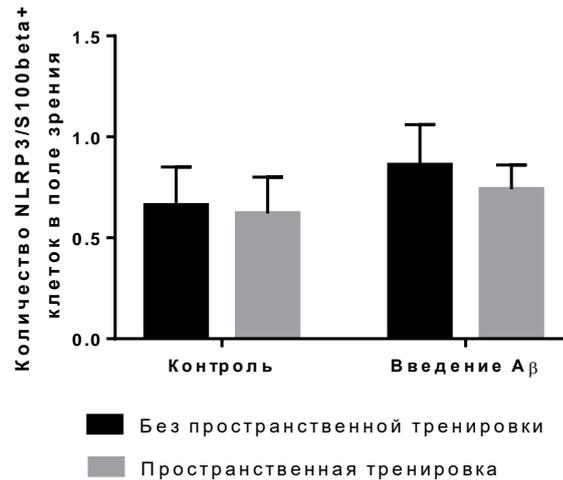


Рисунок 33 – Количество NLRP3/S100beta+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Однако, была продемонстрирована высокая степень колокализации этих двух маркеров в исследуемых группах (Рисунок 34).

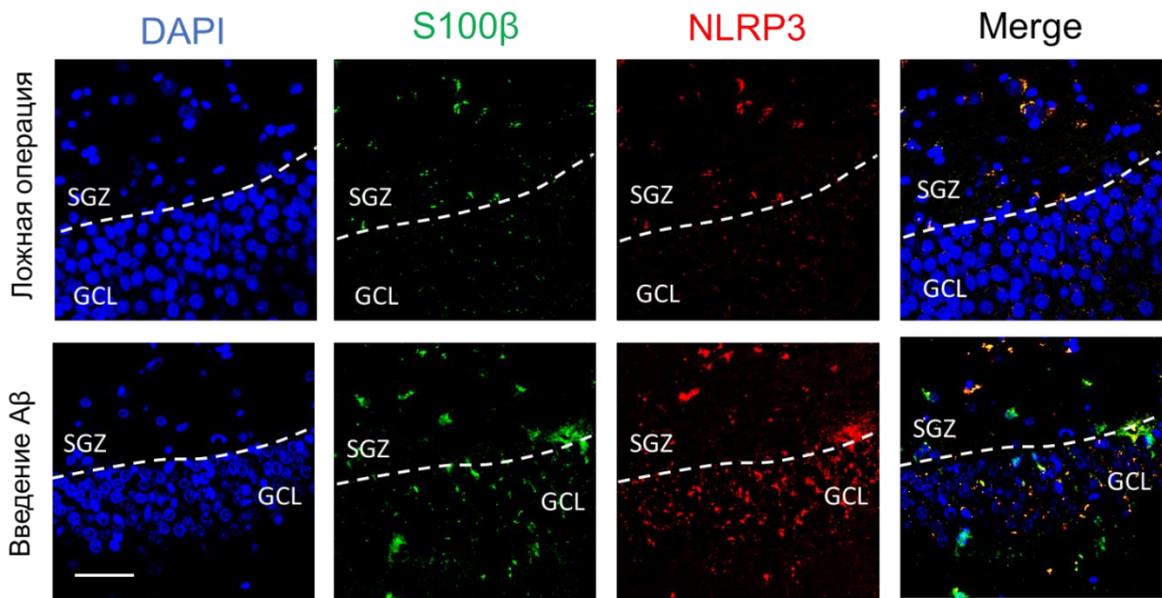


Рисунок 34 – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия Nestin (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Таким образом, не выявлено статистически значимых различий в экспрессии NLRP3 инфламмасом клетками астроглиальной природы в группах с моделированием нейродегенерации и контрольными крысами.

Не выявлено статистически достоверных различий в экспрессии NLRP3 инфламмасом зрелыми нейронами: влияние взаимодействия двух факторов (пространственной тренировки в ВЛМ и операции) ($F(1,24) = 0,8686$, $p=0,3606$, двухфакторный ANOVA). При множественном попарном сравнении между группами с использованием критерия Tukey's различий выявлено не было, тем не менее обучение крыс в ВЛМ способствует увеличению экспрессии инфламмасом в зрелых гранулярных нейронах в зубчатой извилине гиппокампа у ложно-оперированных животных ($p=0,4214$) (Рисунок 35).

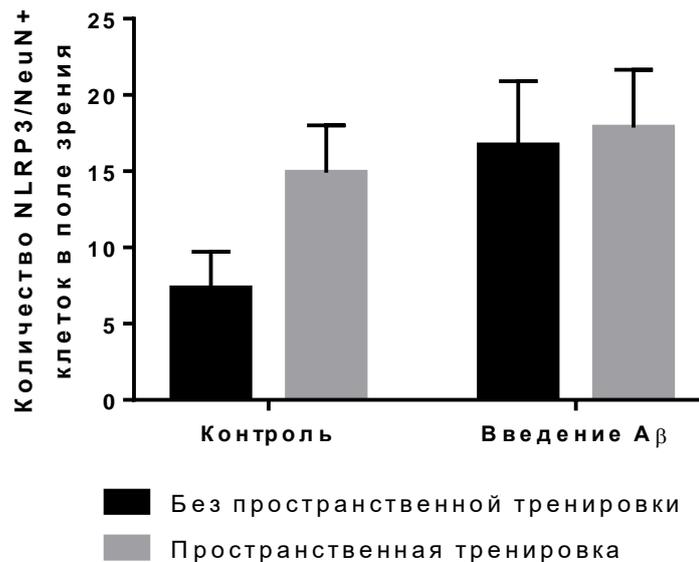


Рисунок 35 – Количество NLRP3/NeuN+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировкой. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Уровень экспрессии CD38 и CD157 в зрелых гранулярных нейронах субгранулярного слоя и гранулярного слоя зубчатой извилины при экспериментальной болезни Альцгеймера

В субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа у животных с токсическим воздействием бета-амилоида локализация CD38 в зрелых нейронах была статистически значимо ниже ($0,42 \pm 0,021$) по сравнению с контрольной группой животных ($0,49 \pm 0,22$) ($p=0,0373$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 36,37).

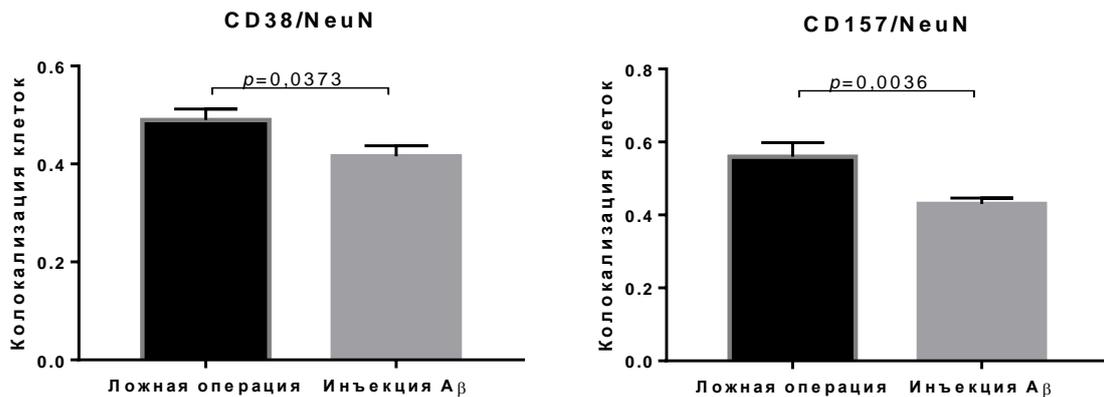


Рисунок 36 – (А) Количество CD38/NeuN+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах после проведения ложной операции и инъекции Aβ1-42. (Б) – Количество CD157/NeuN+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах после проведения ложной операции и инъекции Aβ1-42

В субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа выявлена такая же тенденция экспрессии CD157. CD157 в зрелых гранулярных нейронах: в группах контроля колокализация выше ($0,56 \pm 0,04$) в сравнении с введением бета-амилоида ($0,43 \pm 0,016$) ($p=0,0036$, критерий Манна-Уитни). Это позволяет заключить о сходном паттерне экспрессии молекул одного семейства НАД⁺-конвертирующих ферментов в зрелых гранулярных нейронах нейрогенной ниши головного мозга (Рисунок 36, 38).

Гранулярный слой зубчатой извилины в основном состоит из первичных возбуждающих нейронов, обеспечивающих когнитивные функции, такие как память и обучение [46]. Соответственно, повреждение данного типа нейронов может привести к когнитивным нарушениям в социальной и несобственной сфере.

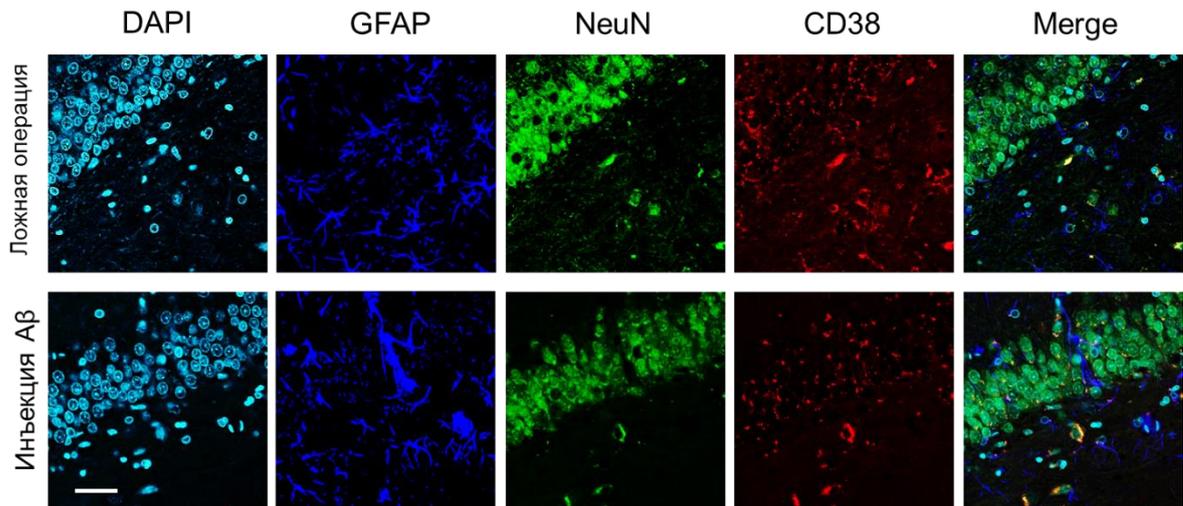


Рисунок 37 – Иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия GFAP (синий), в третьей колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в четвертой колонке – экспрессия CD38 (красный), в пятой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100мкм.

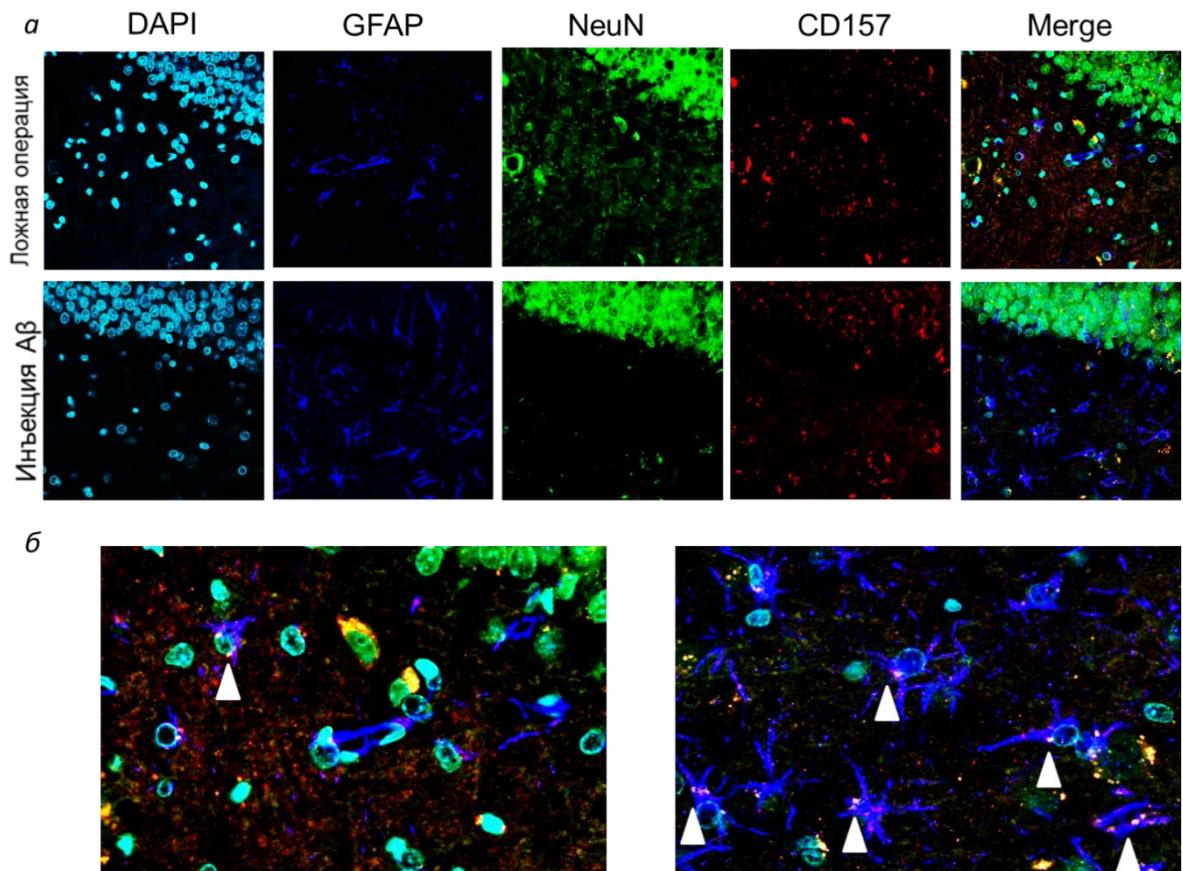


Рисунок 38 – Иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия GFAP (синий), в третьей колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в четвертой колонке – экспрессия CD38 (красный), в пятой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100мкм. (Б) Наложение сигналов, масштабная шкала – 50 мкм.

Уровень экспрессии CD38 и CD157 в астроцитах субгранулярного слоя зубчатой извилины при экспериментальной болезни Альцгеймера

Известно, что значительный пул клеток нейрогенных ниш представлен астроцитами, которые сохраняют свойства стволовых клеток на протяжении всей жизни [47], а метаболическая перестройка астроглии, астродегенерация и формирование aberrантных межклеточных взаимодействий сопровождают прогрессирование хронической нейродегенерации. Одним из подходов определения роли CD38 и CD157 в развитии нейровоспаления является изучение экспрессии данных молекул в клетках астроглиальной природы, участвующих как в регуляции процессов нейрогенеза, так и воспаления.

Был определен уровень экспрессии CD38 в клетках, экспрессирующих GFAP. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) основным маркером астроцитов, позволяющим идентифицировать астроциты в центральной нервной системе.

При исследовании глиальных клеток, экспрессирующих GFAP в субгранулярной зоне зубчатой извилины, выявлено увеличение размеров астроцитов, утолщение и удлинение их отростков, что может свидетельствовать об активации астроцитов и проявлении реактивного астроглиоза.

При определении экспрессии CD38 в астроцитах, экспрессирующих GFAP, было установлено, что после токсического воздействия A β на гиппокамп экспрессия CD38 в субгранулярном слое зубчатой извилины статистически значимо увеличивается ($0,057 \pm 0,004$) по сравнению с группой контрольных животных ($0,039 \pm 0,01$) ($p=0,0358$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 39). При оценке экспрессии CD157 в клетках глиальной природы, экспрессирующих GFAP, было зафиксировано достоверное увеличение данного маркера в группе с интрацеребральным введением A β ($0,09 \pm 0,005$) по сравнению с контрольной группой ($0,07 \pm 0,01$) ($p=0,0232$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 39). Полученные данные соотносятся с результатами, полученными при исследовании маркера CD38. Следовательно, оба маркера

имеют сходный тип повышенной экспрессии в клетках глиальной природы после токсического воздействия А β .

Таким образом, при моделировании БА обнаружена разнонаправленная экспрессия молекул CD38 и CD157 в клетках зубчатой извилины: увеличение экспрессии на астроцитах, но при этом снижение в нейронах.

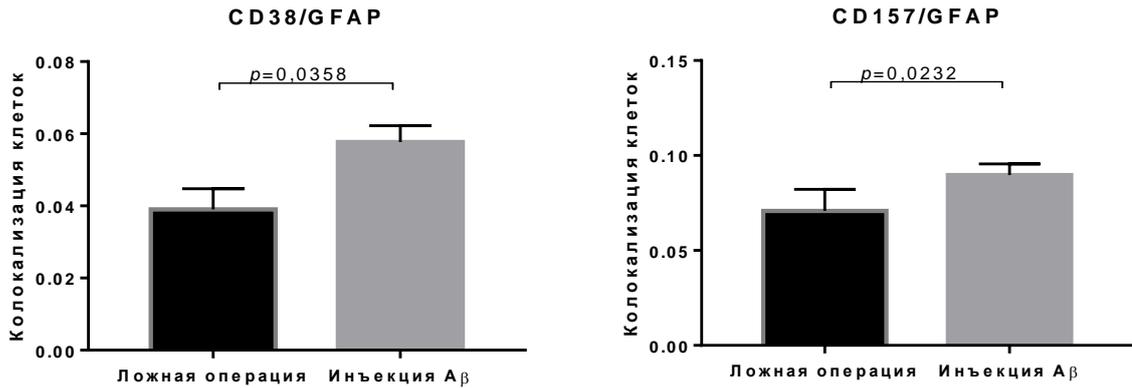


Рисунок 39 – (А) Количество CD38/GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах после проведения ложной операции и инъекции А β 1-42. (Б) – Количество CD157/ GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах после проведения ложной операции и инъекции А β 1-42/

3.2. Результаты исследований ранних изменений в гиппокампальном нейрогенезе при моделировании болезни Альцгеймера и их влияния на процессы кратковременной и отсроченной памяти и нейровоспаления

В данном блоке экспериментов на основании данных, полученных при исследовании запоминания, процессов нейрогенеза и нейровоспаления на крысах, изучали действие растворимых форм бета-олигомеров A β 1-42 на ранние этапы гиппокампального нейрогенеза, а также экспрессию инфламмасом и процессы кратковременной и отсроченной памяти у мышей линии CD1.

Введение растворимых олигомеров бета-амилоида вызывает снижение активированных стволовых клеток в субгранулярной зоне гиппокампа мышей

Исследуя экспрессию молекулы CD133, маркирующей плюрипотентные стволовые клетки выявлено не выявлено статистически значимых различий в экспрессии CD133+ клеток при моделировании БА ($11,6 \pm 0,74$) и в группе контроля ($13,4 \pm 0,8$) ($p=0,1245$, критерий Манна-Уитни), однако наблюдалась некоторая тенденция к снижению экспрессии данного маркера при моделировании болезни Альцгеймера (Рисунок 40).

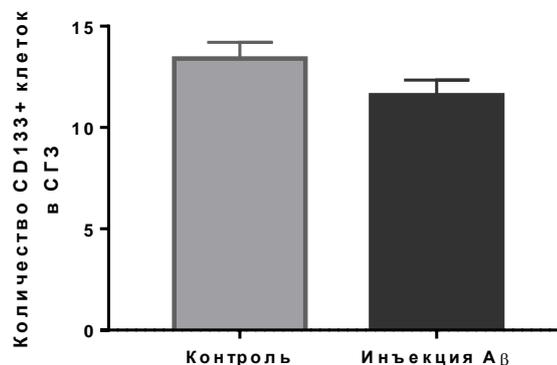


Рисунок 40 – Количество CD133+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Однако, определяя экспрессию стволовых клеток, которые находятся в стадии пролиферации, было использовано антитело Ki67, которое окрашивает только активно пролиферирующие клетки и не окрашивает те, которые находятся в состоянии покоя (т.е. молчащие стволовые клетки). Экспрессия Ki67+ клеток в субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа статистически значимо меньше ($2,3 \pm 0,9$) после введения бета-амилоида в сравнении с группой контроля ($7,2 \pm 1,7$) ($p=0,0256$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 41).

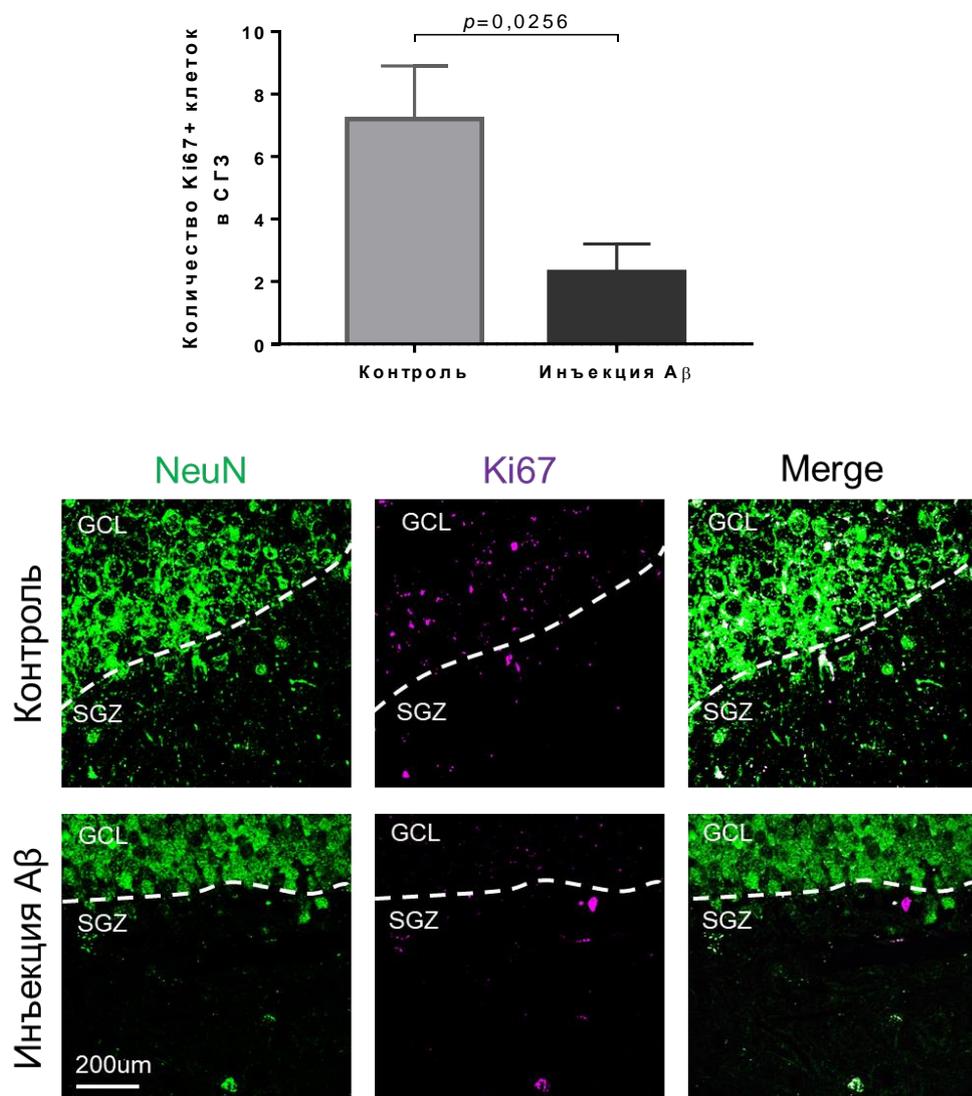


Рисунок 41 – (А) Количество Ki67+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке экспрессия NeuN (зеленый), во второй колонке – экспрессия Ki67 (сиреневый), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 200мкм.

Также было определено число мультипотентных стволовых клеток, экспрессирующих Nestin. После инъекции растворимых форм бета-олигомеров в гиппокамп мышей отмечается статистически значимое снижение Nestin+ клеток ($6,4 \pm 2,3$) по сравнению с контролем ($16,7 \pm 3,8$) ($p=0,0388$, критерий Манна-Уитни). Таким образом, амилоид-индуцированные изменения в гиппокампе сопровождаются снижением числа активированных, делящихся стволовых клеток в зубчатой извилине (Рисунок 42).

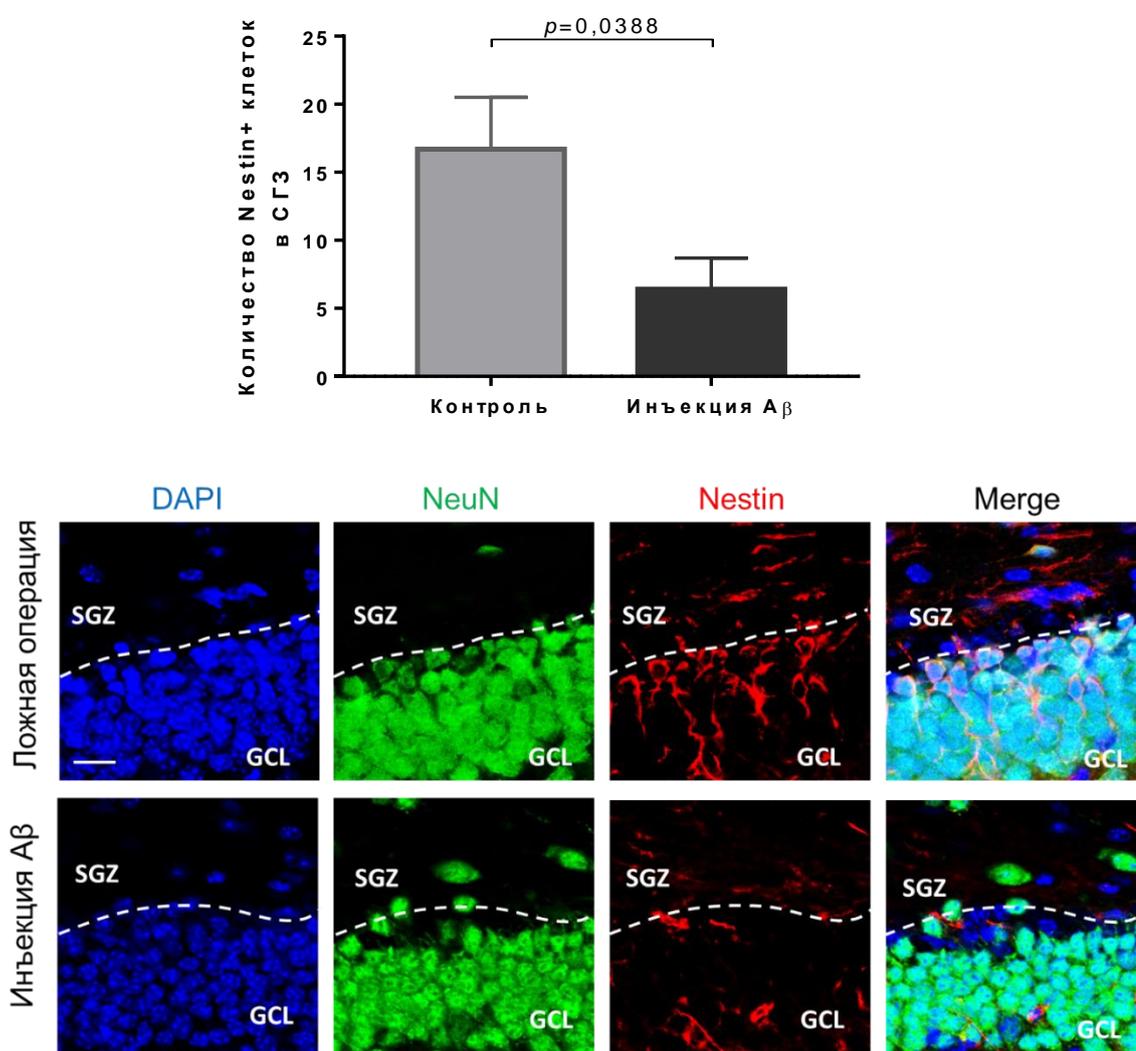


Рисунок 42 – (А) Количество Nestin+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия Nestin (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Введение растворимых олигомеров бета-амилоида вызывает нарушение радиальной миграции клеток

Результат влияния бета-амилоида на миграцию клеток нейрональной природы изучали с использованием специального протокола изучения миграции вновь образованных клеток, которые инкорпорируют BrdU.

Было проведено изучение количества вновь образованных клеток, экспрессирующих BrdU, и характер миграции таких клеток. Эвтаназию мышам проводили на 3 день после повторяющихся инъекций BrdU (на 6 день после первой инъекции BrdU). Согласно классическим представлениям, миграция нейробластов в процессе нейrogenеза во взрослом мозге протекает в два этапа. На первом этапе стволовые плюрипотентные клетки начинают давать рост базальным нейрональным прогениторным клеткам. Этот этап занимает в среднем три дня. После приобретения свойств клеток нейронального ростка с 4-х суток базальные нейрональные прогениторы становятся нейробластами и начинается процесс радиальной миграции. Через 6-7 дней, эти клетки приобретают все свойства зрелых нейронов, которые экспрессируют маркер NeuN. Эта двухступенчатая модель миграции была использована для оценки результатов миграции клеток [374].

В ходе исследования было выявлено, что инъекция A β 1-42 олигомеров в гиппокамп мышей не приводит к изменению общего числа BrdU+ клеток в гиппокампе в сравнении с группой контроля (Рисунок 43). Однако имеются различия в характере миграции нейробластов в исследуемых группах. В контрольной группе мышей нейробласты за исследуемый период мигрировали из субгранулярного в гранулярный слой зубчатой извилины и колокализируются с маркером зрелых нейронов NeuN. Это наблюдение подтверждается преимущественной локализацией BrdU-инкорпорированных клеток в гранулярном слое и высоким коэффициентом перекрытия сигналов (BrdU и NeuN) в контроле ($0,79 \pm 0,04$) по сравнению с мышами с БА ($0,15 \pm 0,03$) ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 43).

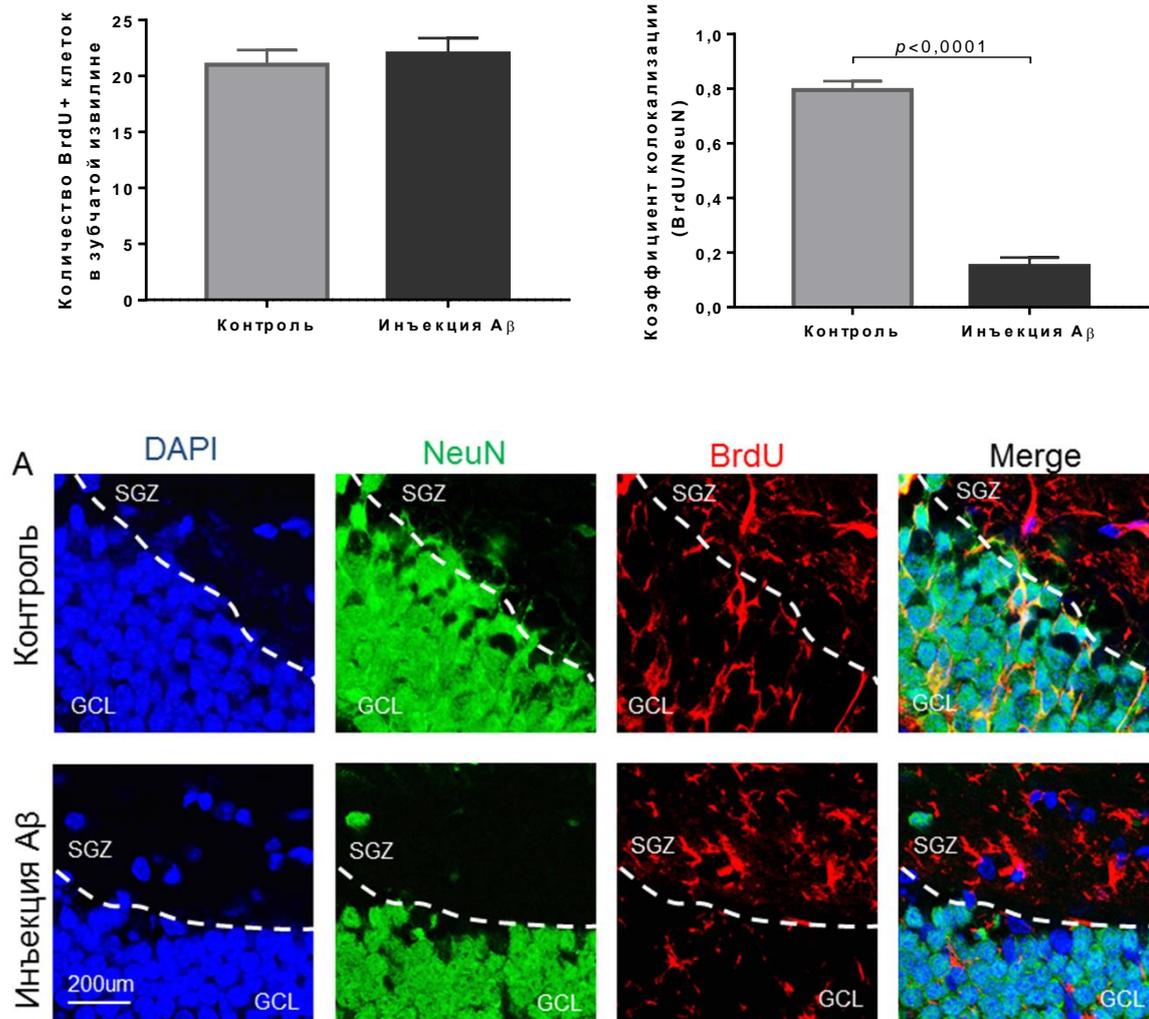


Рисунок – (А) Количество BrdU+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Коэффициент колокализации (перекрытия сигналов) BrdU/NeuN. (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия BrdU (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 200мкм.

Таким образом, у животных с инъекцией бета-амилоида, несмотря на сохранение пула нейробластов, нарушен процесс радиальной миграции, что может в конечном итоге приводить к нарушенному или отсроченному процессу созревания нейронов.

Данные результаты подтверждаются анализом экспрессии PSA-NCAM (Рисунок 44).

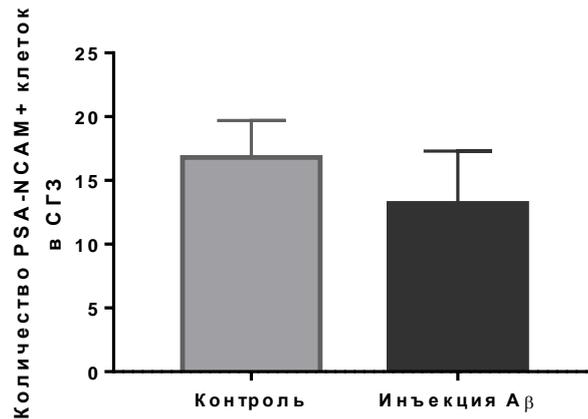


Рисунок 44 – Количество PSA-NCAM+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Введение растворимых олигомеров бета-амилоида вызывает увеличение апоптоза в нейрогенной нише

Поскольку при изучении ранних этапов нейрогенеза выявлено, что введение олигомеров бета-амилоида приводит к снижению числа активно пролиферирующих стволовых клеток, нарушению процесса миграции, следовательно, возможно предположить, что у вновь образованных нейронов может быть выявлено снижение выживаемости.

Был изучен апоптоз методом TUNEL в ткани головного мозга в группе мышей контроля и у мышей с инъекцией бета-амилоида. Результаты в данном эксперименте представлены как процент апоптотических клеток к общей популяции клеток в исследуемой ткани.

После введения Аβ1-42 олигомеров отмечено статистически значимое увеличение процента клеток в апоптозе в зубчатой извилине гиппокампа ($14,24 \pm 0,65(\%)$) в сравнении с контрольными мышами ($6,93 \pm 0,27(\%)$) ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 45).

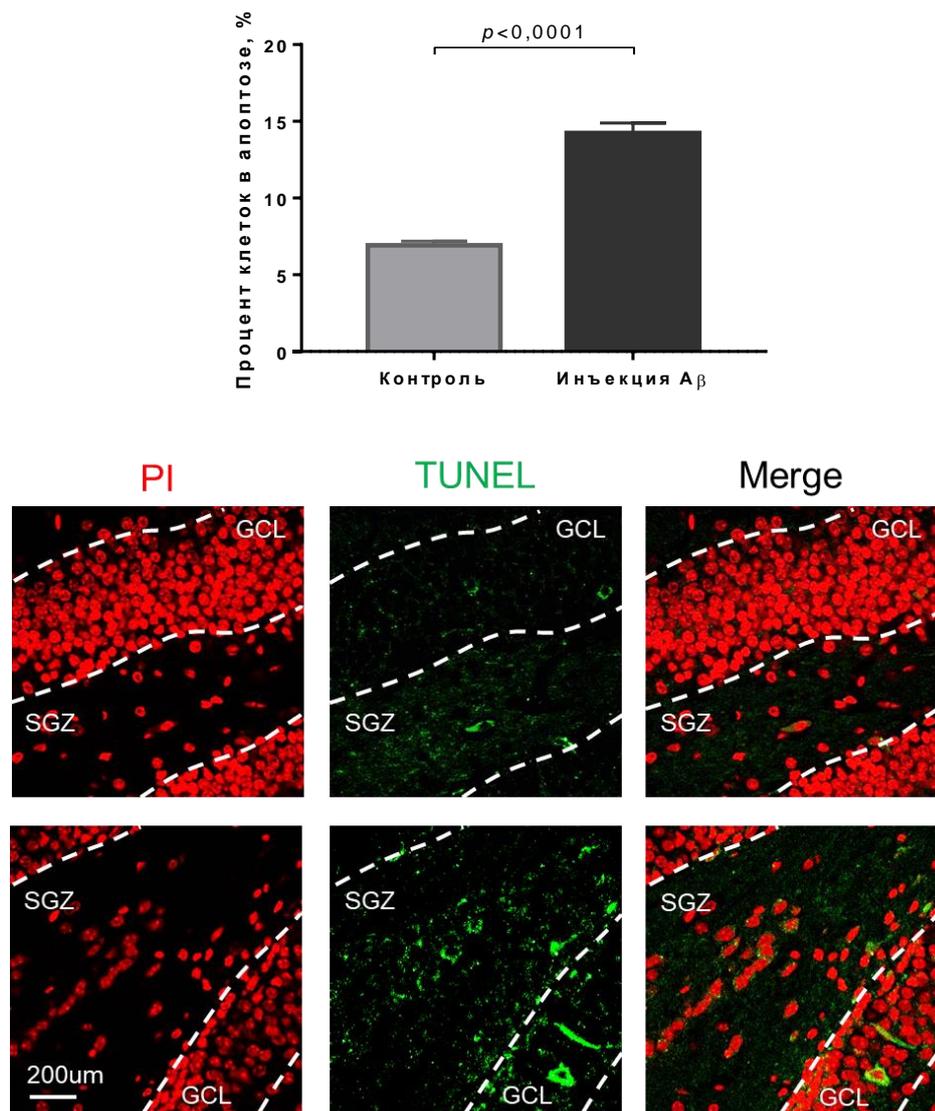


Рисунок 45 – (А) Процент клеток в апоптозе в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Результаты окрашивания метолом TUNEL для выявления апоптотических клеток в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены PI (красный), во второй колонке – апоптотические клетки (зеленый), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 200мкм.

Экспрессия маркеров клеток астроглиальной природы после инъекции олигомеров бета-амилоида

После инъекции в гиппокамп растворимых олигомеров бета-амилоида зафиксировано статистически значимое увеличение числа клеток, которые экспрессируют Ca^{2+} связывающий белок S100β ($6,1 \pm 0,29$), по сравнению с контрольной группой после инъекции PBS ($2,45 \pm 0,38$) ($p < 0,0001$, критерий

Манна-Уитни). Следовательно, индуцированные инъекцией растворимых форм бета-амилоида изменения в гиппокампе приводят к значительному увеличению числа протоплазматических S100beta+ астроцитов.

При иммуногистохимическом исследовании GFAP+ астроцитов мы выявили, что экспрессия GFAP+ клеток статистически значимо не изменялась при моделировании нейродегенерации ($5,50 \pm 0,89$) и в группе контроля ($7,8 \pm 0,63$) ($p=0,1$, критерий Манна-Уитни).

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в экспрессии GFAP-позитивных астроцитов, основываясь на морфологии клеток, мы обнаружили изменения, характерные для реактивного астроглиоза при нейрогенерации. Так было зафиксирована гипертрофия тела клетки, удлинение отростков по сравнению с астроцитами в головном мозге животных контрольной группы (Рисунок 46).

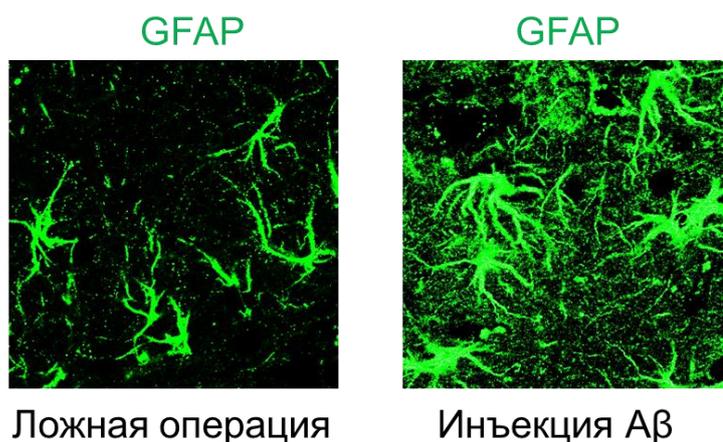


Рисунок 46 – Микрофотография иммунофлюоресцентного окрашивания GFAP+ астроцитов в группе после проведения ложной операции и инъекции бета-амилоида.

Результаты исследования особенностей экспрессии инфламмасом на нейрональных предшественниках в норме и при введении бета-олигомеров

На данном этапе исследования изучали экспрессию NLRP3 в клетках ранних этапов нейрогенеза. В плюрипотентных стволовых клетках, экспрессирующих маркер CD133, была определена локализация молекулы NLRP3. При введении растворимых форм бета-амилоида в гиппокамп мышей

зафиксировано статистически значимое увеличение числа CD133 клеток, которые колокализуются с NLRP3 инфламмасомами ($89,0 \pm 8,1$ (%)) в сравнении с группой контроля ($44 \pm 7,4$ (%)) ($p=0,0015$, критерий Манна-Уитни). Данный факт подтверждается подсчетом коэффициент перекрытия по Mander's $0,6 \pm 0,07$ и $0,94 \pm 0,01$ для группы с введением A β 1-42 и группы с введением PBS, соответственно ($p=0,009$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 47).

Также была определена колокализация маркера мультипотентных стволовых клеток, экспрессирующих маркер Nestin, в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа, а также в субвентрикулярной зоне, которая также является нейрогенной нишей головного мозга в постнатальном периоде. Кроме того, важным является изучение направленной миграции нейрональных предшественников, поэтому исследование экспрессии инфламмасом также проводили в ростральном миграционном пути.

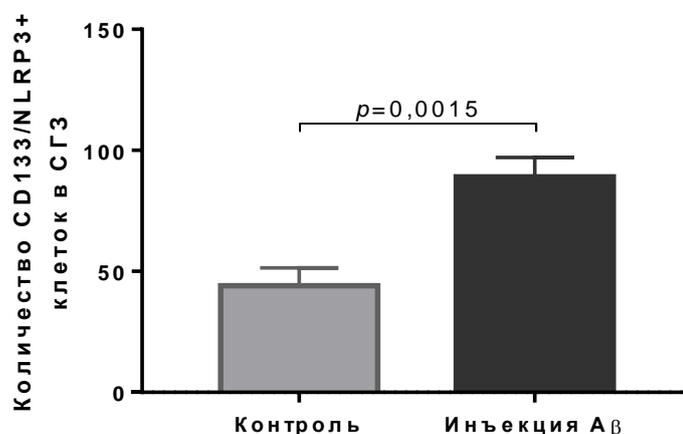


Рисунок 47 – (А) Количество CD133/NLRP3+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

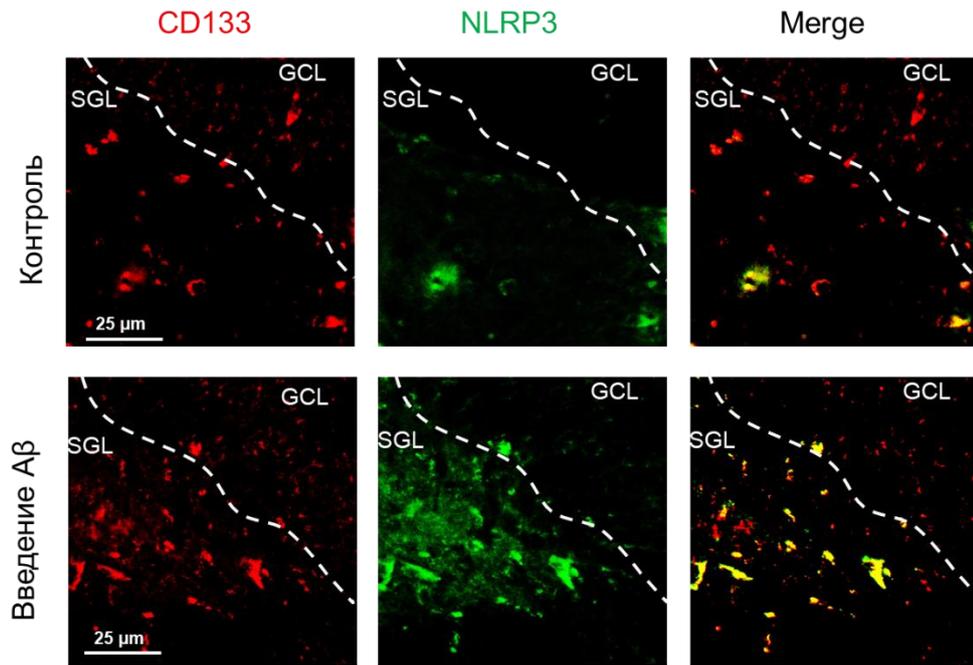


Рисунок 47 – (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке экспрессия CD133 (красный), во второй колонке – экспрессия NLRP3 (зеленый), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона.

В контрольной группе животных, после проведения ложной операции, было выявлено, что $17,64 \pm 0,79\%$ нейрональных предшественников в пределах субгранулярной зоны зубчатой извилины экспрессируют инфламмосомы NLRP3, в то время как при экспериментальной болезни Альцгеймера около половины таких клеток экспрессируют NLRP3 ($51,55 \pm 0,78\%$). Данные различия статистически значимо ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни) подтверждают, что при нейродегенерации происходит значительное увеличение экспрессии инфламмосом не только клетками микроглии, но и нейрональными предшественниками (Рисунок 48).

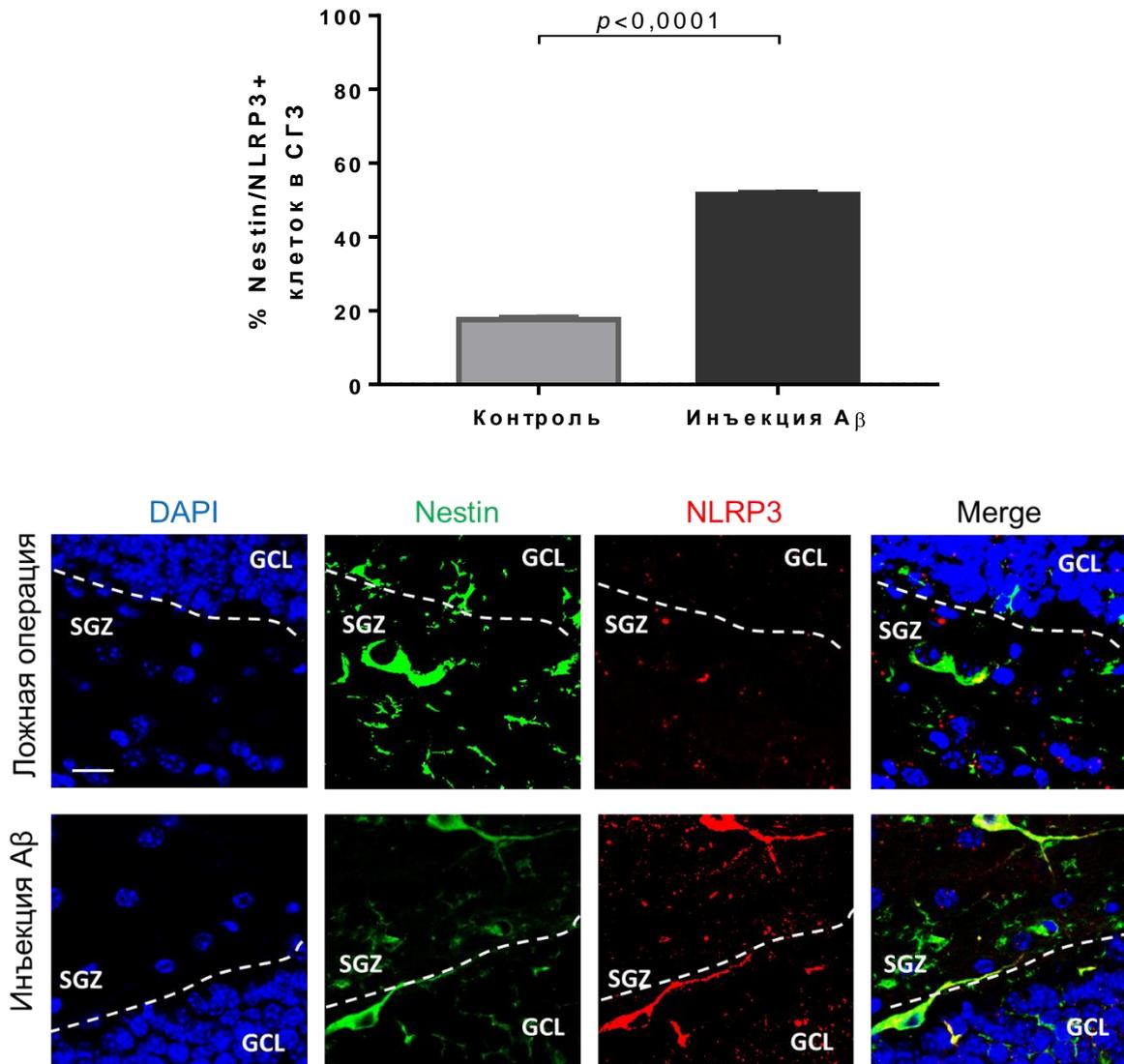


Рисунок 48 – (А) Количество Nestin/NLRP3+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампа́льная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампа́льная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия Nestin (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

В субвентрикулярной зоне наблюдается аналогичная ситуация: при нейродегенерации достоверно увеличивается экспрессия NLRP3 клетками предшественниками, экспрессирующими Nestin, и составляет $75,98 \pm 0,95\%$, в контрольной группе данный показатель $17,32 \pm 0,95\%$ ($p < 0,001$, критерий Манна-Уитни).

Не менее важным является то, что процент клеток, колокализирующих Nestin и NLRP3 в ростральном миграционном пути, увеличивается при экспериментальной болезни Альцгеймера ($70,3 \pm 0,72\%$), в то время как при проведении ложной операции этот показатель составляет $45,94 \pm 0,97\%$ ($p=0,075$, критерий Манна-Уитни).

Соответственно, возможно предположить, что повышенная экспрессия инфламмасом NLRP3-подтипа может приводить к последующему неэффективному нейрогенезу в нейрогенных нишах и нарушенной миграции нейрональных предшественников и их последующего созревания в других регионах головного мозга.

Результаты исследования особенностей экспрессии NLRP3 инфламмасом в GFAP+ астроцитах и протоплазматических астроцитах, функционирующих в пределах нейрогенных ниш, и медиаторов воспаления (ИЛ-1 и HMGB-1) на GFAP+ астроцитах в норме и после инъекции бета-олигомеров

Поскольку к числу наименее изученных молекулярных событий при нейровоспалении следует отнести процесс формирования инфламмасом при действии олигомеров $A\beta$ в клетках глиальной природы, а также до сих пор остается открытым вопрос экспрессии астроцитами $IL1\beta$ в настоящем исследовании мы исследовали экспрессию NLRP3 и $IL1\beta$ на астроцитах при амилоид-индуцированной нейродегенерации.

В клетках, экспрессирующих S100beta, был определен коэффициент колокализации с маркером инфламмасом NLRP3. В субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа мышей после ложной операции процент колокализации S100beta/NLRP3 составил $86,11 \pm 5,19\%$, что статистически достоверно не отличалось от показателей у мышей после проведения моделирования нейродегенерации $75,25 \pm 4,75\%$ ($p=0,0724$). Данные подтверждены с помощью определения коэффициента перекрытия – после введения PBS ($0,76 \pm 0,06$), что не отличается от группы мышей после инъекции бета-олигомеров $0,81 \pm 0,02$ ($p=0,68$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 49).

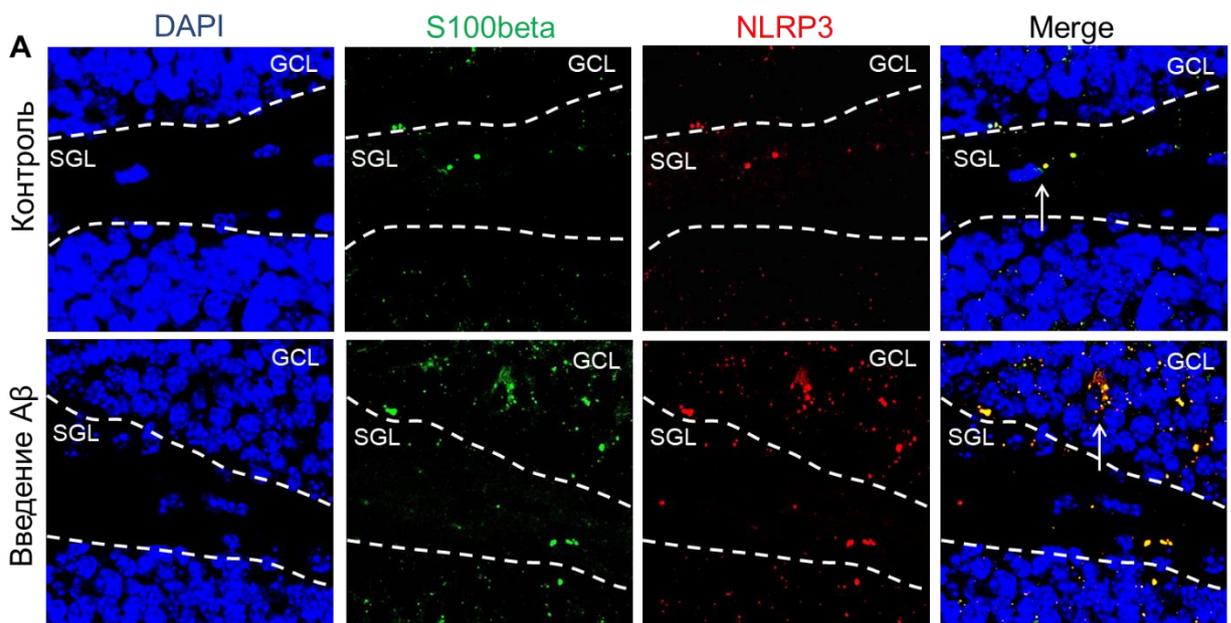
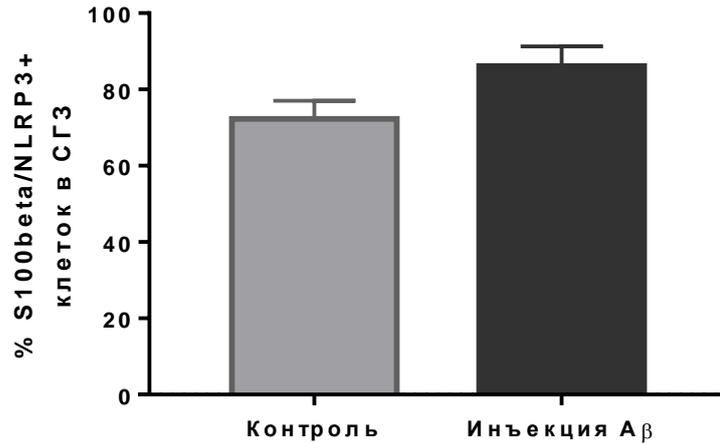


Рисунок 49 – (А) Количество S100beta/NLRP3+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия S100beta (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Изучая колокализацию маркеров астроцитов GFAP и NLRP3 типа инфламмасом установлено статистически значимое увеличение коэффициента перекрытия по Mander's в группе после введения растворимых форм бета-олигомеров в гиппокамп мышам ($0,75 \pm 0,2$) по сравнению с группой контроля ($0,24 \pm 0,12$) ($p=0,0493$) (Рисунок 50).

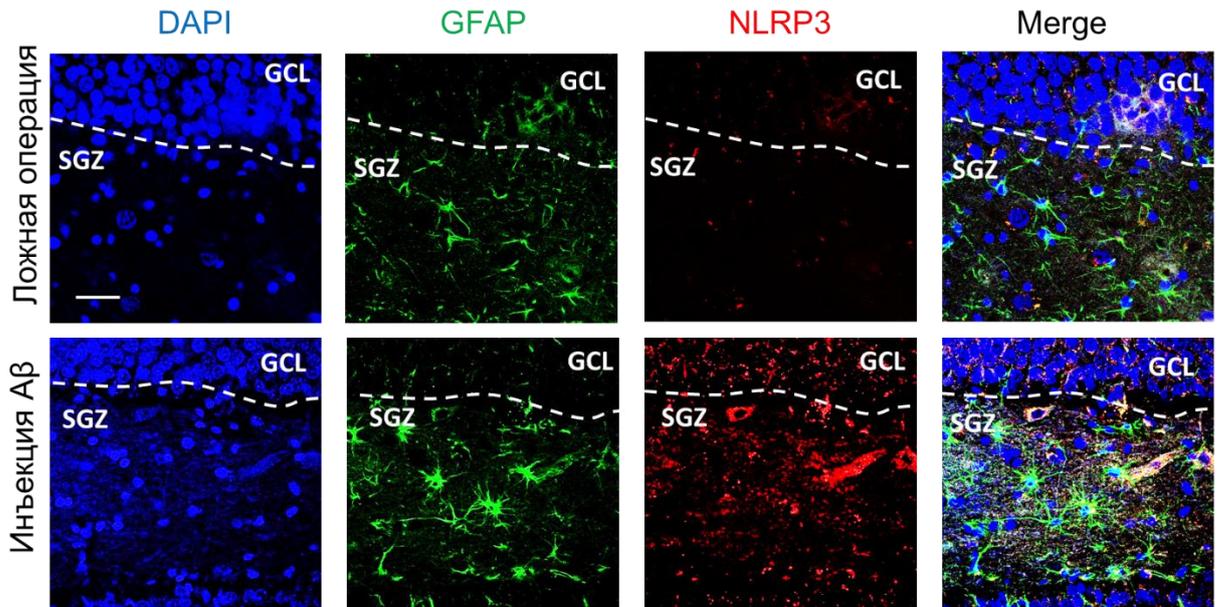


Рисунок 50– Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия GFAP (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

С целью определения функциональной активности NLRP3 инфламмасом в астроцитах, была изучена экспрессия данными клетками провоспалительного интерлейкина $IL1\beta$. Важной находкой данного исследования является подтверждение экспрессии $IL1\beta$ GFAP⁺ астроцитами. Было выявлено, что при моделировании амилоид-индуцированной нейродегенерации происходит статистически значимое увеличение колокализации этих двух маркеров, что проявляется высоким коэффициентом перекрытия по Mander's у экспериментальной группы с введением олигомеров бета-амилоида ($0,73\pm 0,007$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($0,39\pm 0,04$) ($p=0,002$) (Рисунок 51).

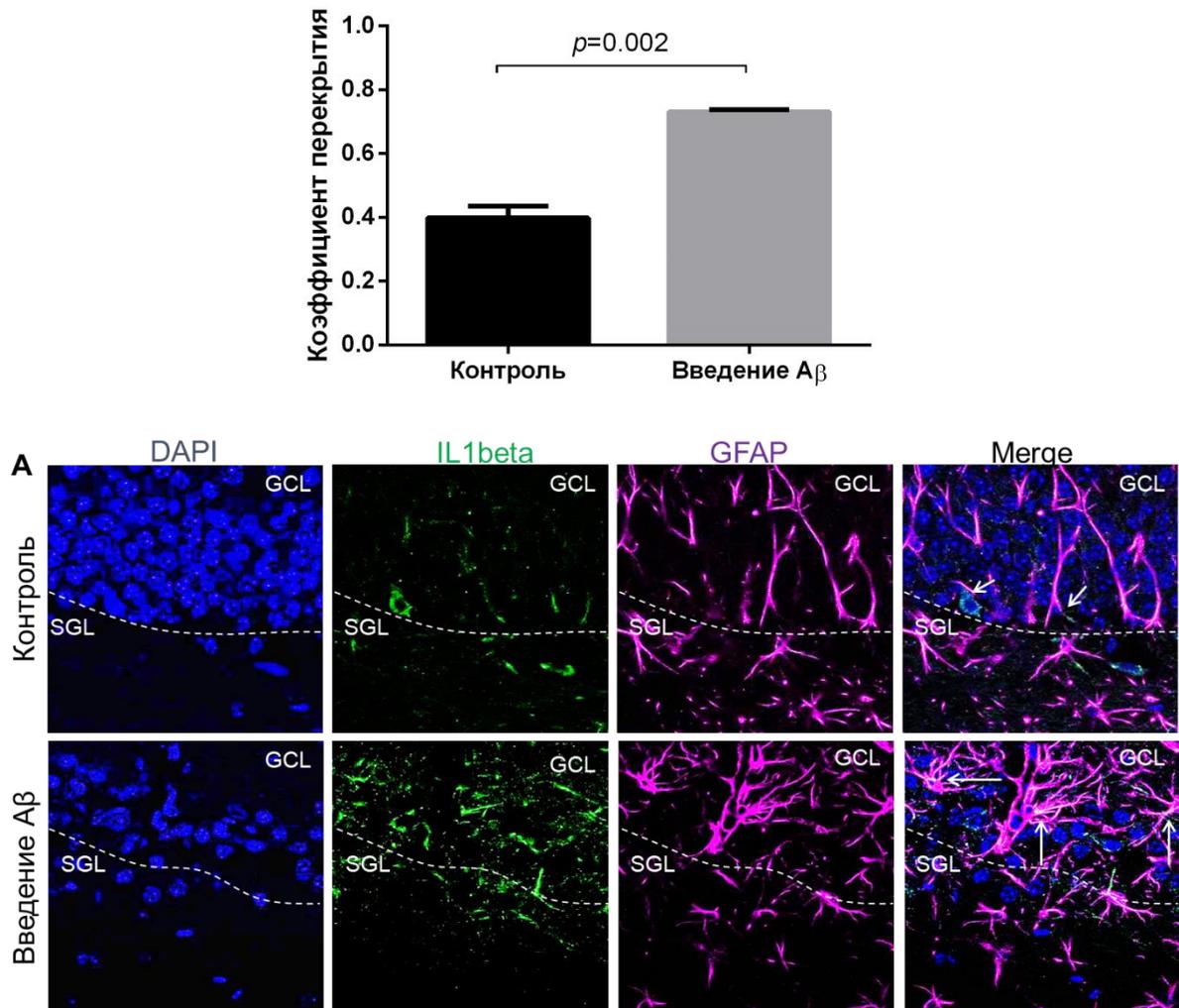


Рисунок 51 – (А) Коэффициент перекрытия по Mander's IL1beta/GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия IL1beta (зеленый), в третьей колонке – экспрессия GFAP (сиреневый), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

В ИГХ исследовании зафиксировано статистически значимое увеличение экспрессии HMGB-1 на GFAP+клетках в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа у мышей после проведения моделирования нейродегенерации – коэффициент по Mander's ($0,48 \pm 0,1$) по сравнению с контрольными мышами ($0,87 \pm 0,14$) ($p=0,0427$) (Рисунок 52).

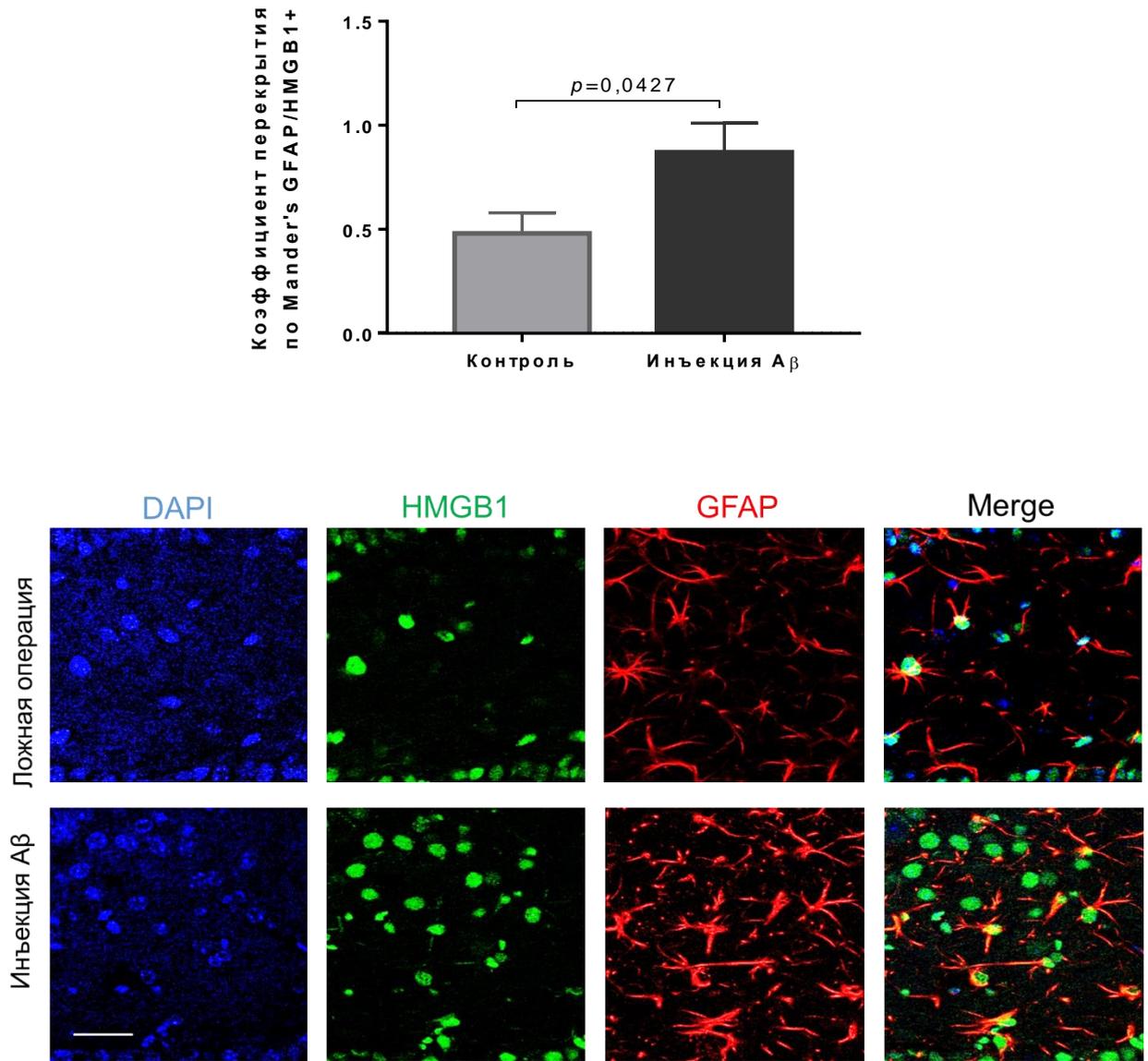


Рисунок 52 – (А) Коэффициент перекрытия по Mander's HMGB1/GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия HMGB1 (зеленый), в третьей колонке – экспрессия GFAP (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100мкм.

3.3. Результаты исследования особенностей экспрессии NLRP3 инфламмасом в GFAP+ астроцитах и NeuN+ гранулярных нейронах мышей с трансгенной моделью болезни Альцгеймера (5xFAD)

У мышей с генетической формой болезни Альцгеймера была определена экспрессию NLRP3 инфламмасом в гиппокампе в клетках астроглиальной и нейрональной природы. Выявлено статистически значимое увеличение локализации NLRP3 инфламмасом клетками, экспрессирующими GFAP, по увеличению коэффициента перекрытия по Mander's у трансгенных мышей с БА ($0,84 \pm 0,12$) в сравнении с контролем ($0,32 \pm 0,13$) ($p=0,0124$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 53). При этом не было выявлено статистически значимых различий в количестве GFAP+ астроцитов между группами с БА и контролем ($10,63 \pm 0,83$ и $9,38 \pm 1,07$ клеток в поле зрения соответственно, $p=0,3739$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 53).

В клетках нейрональной природы, а именно в зрелых гранулярных нейронах определен коэффициент перекрытия по Mander's, который был статистически значимо выше в группе с генетической формой болезни Альцгеймера ($0,9 \pm 0,1$) относительно контроля ($0,18 \pm 0,07$) ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 54).

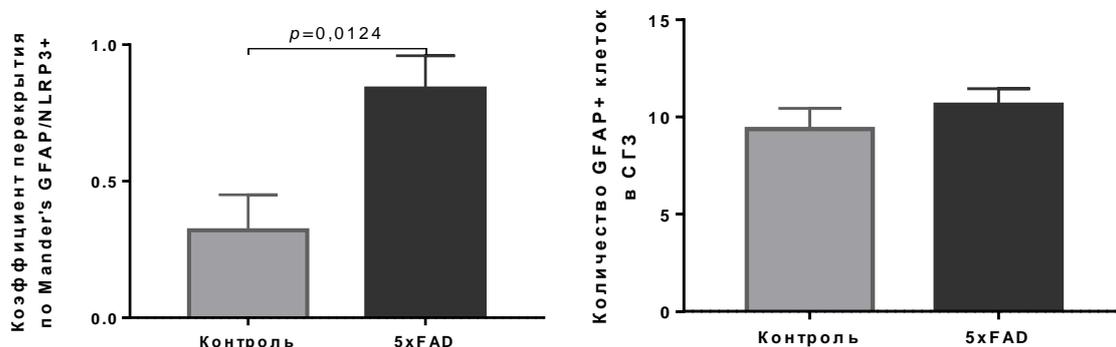


Рисунок 53 – (А) Коэффициент перекрытия по Mander's GFAP/NLRP3+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – мыши дикого типа C57Bl6, 5xFAD – генетическая модель болезни Альцгеймера. (Б) Количество GFAP+ клеток в в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – мыши дикого типа C57Bl6, 5xFAD – генетическая модель болезни Альцгеймера.

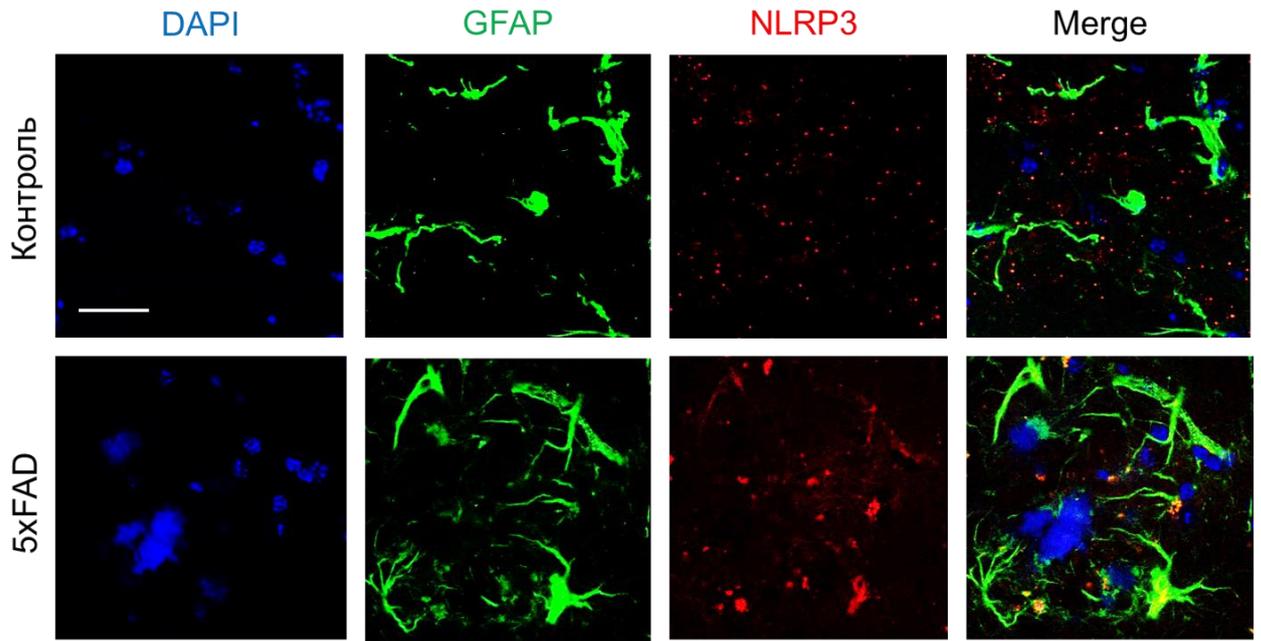


Рисунок 53 (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группе контроля и семейной формы БА: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия GFAP (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 50мкм.

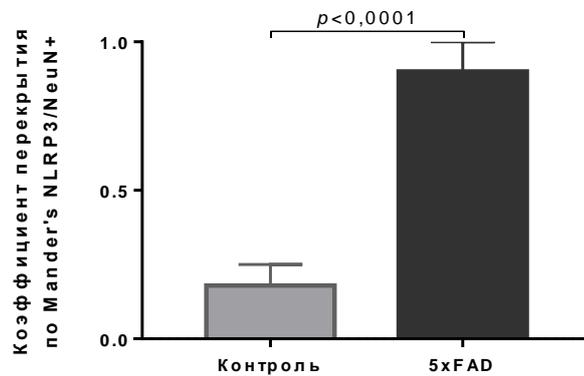


Рисунок 54 – (А) Коэффициент перекрытия по Mander's NeuN/NLRP3+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – мыши дикого типа C57B16, 5xFAD – генетическая модель болезни Альцгеймера.

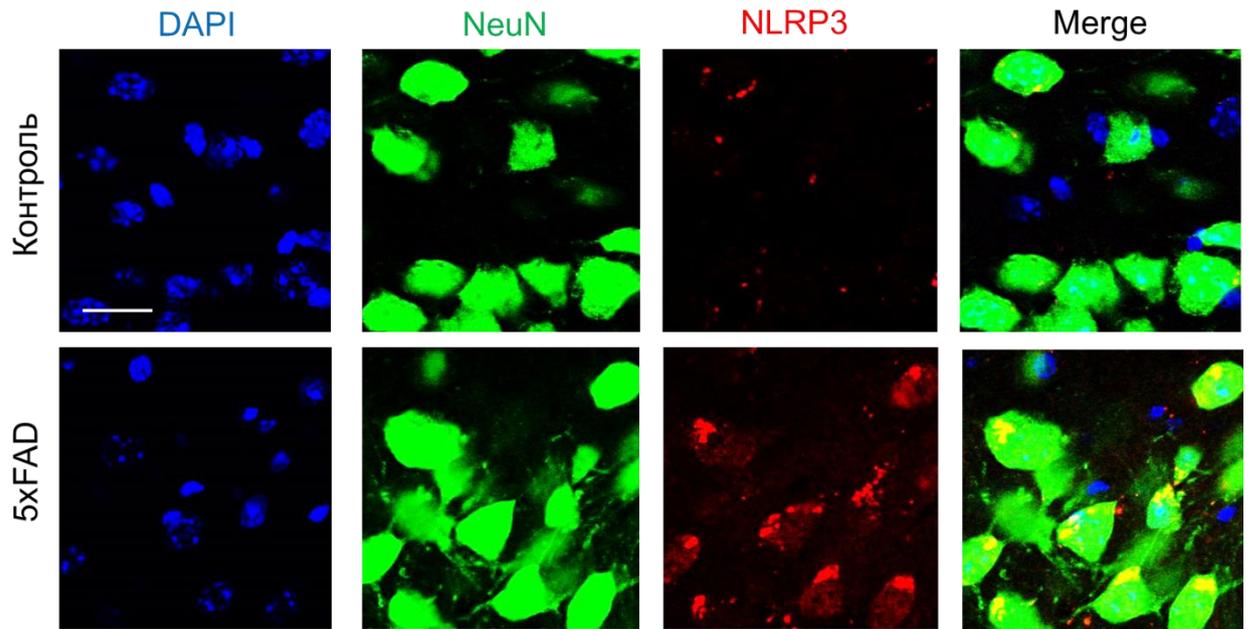


Рисунок 54 –Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группе контроля и семейной формы БА: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 50мкм.

3.4. Изучение эффекта введения олигомеров бета-амилоида на экспрессию генов раннего реагирования после тестирования когнитивных функций. Экспрессия маркеров ангиогенеза и RAGE

Экспрессия c-fos при моделировании болезни Альцгеймера

В данном исследовании было определено, вызывает ли внутригиппокампальные инъекции A β 1-42 изменения экспрессии белка c-Fos в гиппокампе мышей через 1 час после последнего дня тестирования в тесте «Распознавание нового объекта». В срезах головного мозга, которым вводили PBS, мы обнаружили типичную локализацию c-fos в ядрах клеток зубчатой извилины (Рисунок 55).

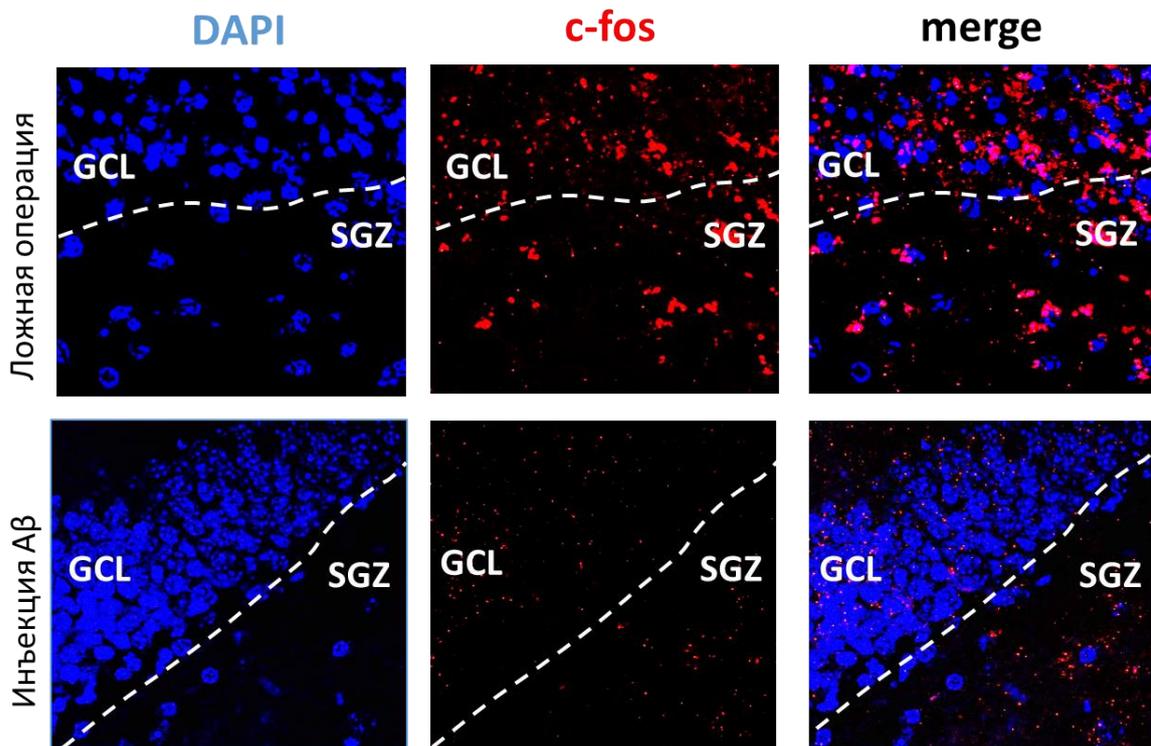


Рисунок 55 – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в группе контроля и после инъекции бета-амилоида. В первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия c-fos (красный), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Инъекция A β – внутригиппокампальная инъекция бета-амилоида, ложная операция – введение PBS.

Количественная оценка иммуноокрашивания c-Fos подтвердила снижение c-Fos в гиппокампе у мышей, которым инъецировали олигомеры A β 1-42 относительно соответствующего контроля.

В ходе исследования выявили, что моделирование БА приводит к снижению числа клеток, экспрессирующих c-fos. Так в группе с БА число таких клеток в поле зрения составило $(3,1 \pm 0,79)$, что статистически значимо меньше по сравнению с группой ложно-оперированных животных $(21,89 \pm 2,23)$ ($p < 0,0001$) (Рисунок 56).

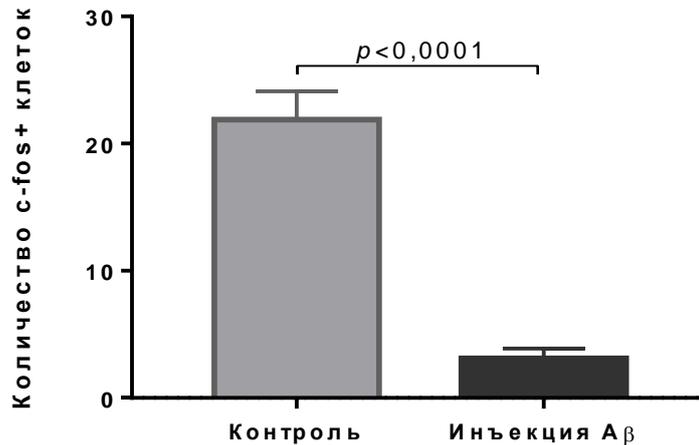


Рисунок 56 – Количество c-fos+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. Инъекция Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-амилоида, ложная операция – введение PBS.

Таким образом, данные результаты показывают, что мыши, которым инъецировали Аβ, демонстрировали заметное снижение иммунореактивности белка c-fos в гиппокампе.

Результаты исследования экспрессии CD31 и JAM1 при моделировании болезни Альцгеймера

В данном блоке исследований была определена экспрессия молекул JAM1 и CD31 в гиппокампе мышей в норме и после введения растворимых форм олигомеров бета-амилоида. Выявлено, что после инъекции Аβ₁₋₄₂ наблюдается статистически достоверное увеличение CD31+ клеток в гиппокампе $(5,5 \pm 0,86)$ по сравнению с группой контроля $(2,375 \pm 0,35)$ ($p = 0,0053$) (Рисунок 57).

Однако в данных клетках обнаружено снижение колокализации с маркером JAM, которая составила ($20,97 \pm 7,02$ %) при введении олигомеров тогда как в контроле наблюдали почти полную колокализацию ($92,7 \pm 5,17$ %) ($p < 0,0001$) (Рисунок 57).

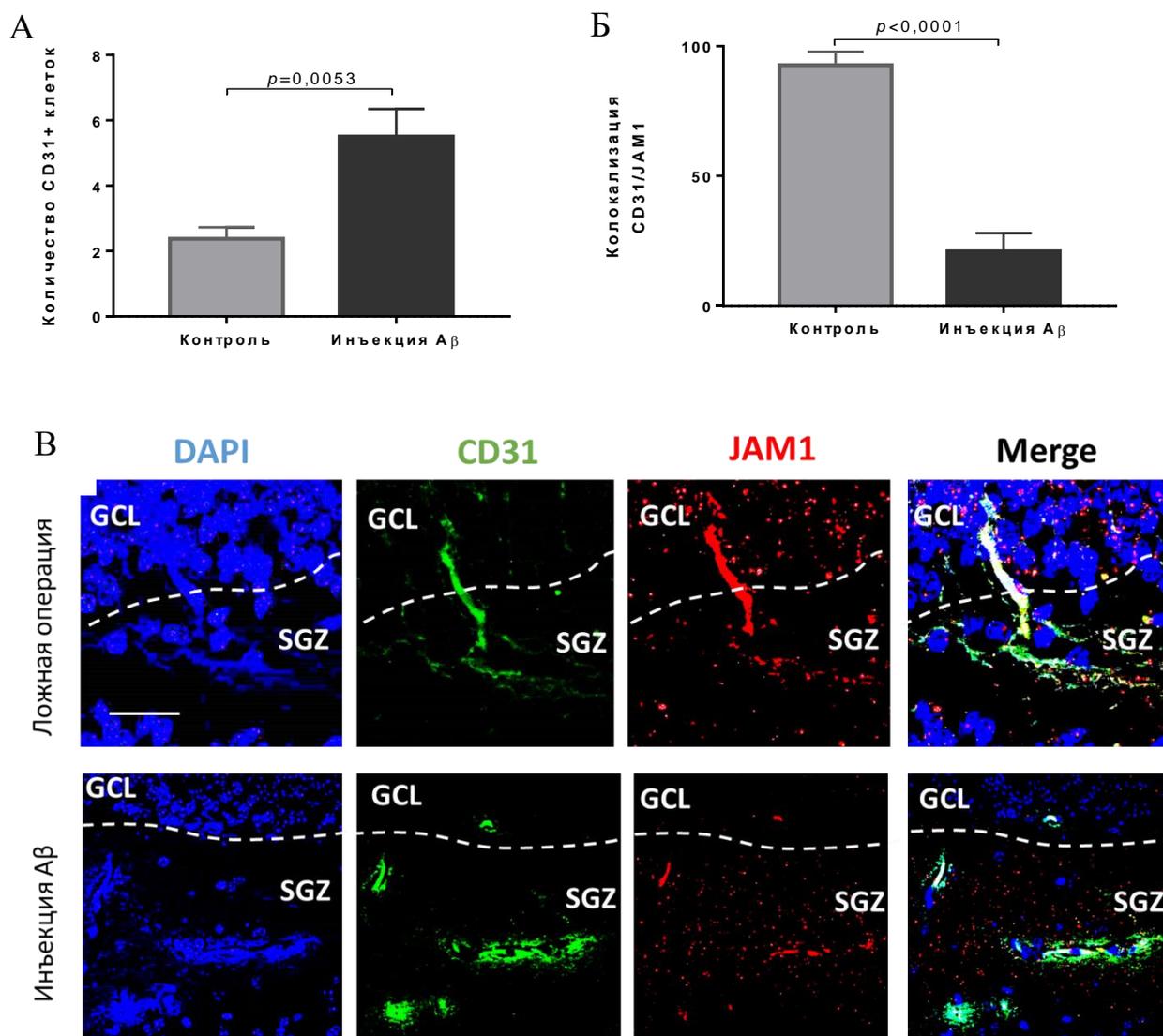


Рисунок 57 – (А) Количество CD31+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б) – Колокализация CD31 и JAM1 в зубчатой извилине гиппокампа. (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия CD31 (зеленый), в третьей колонке – экспрессия JAM1 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 50мкм. Инъекция Аβ – внутригиппокампа́льная инъекция бета-амилоида, ложная операция – введение PBS. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона.

Результаты исследования экспрессии HMGB1 при моделировании болезни Альцгеймера

В данном блоке была определена экспрессия HMGB+ клеток в гиппокампе в группах мышей. Выявлено, что при инъекции A β 1-42 происходит статистически значимое увеличение экспрессии HMGB (4,625 \pm 0,57) по сравнению с группой ложно-оперированных животных с введением PBS (1,75 \pm 0,4) ($p=0,0014$) (Рисунок 58).

Таким образом, моделирование болезни Альцгеймера посредством введения бета-амилоида приводит к увеличению маркера нейровоспаления HMGB1 (Рисунок 58).

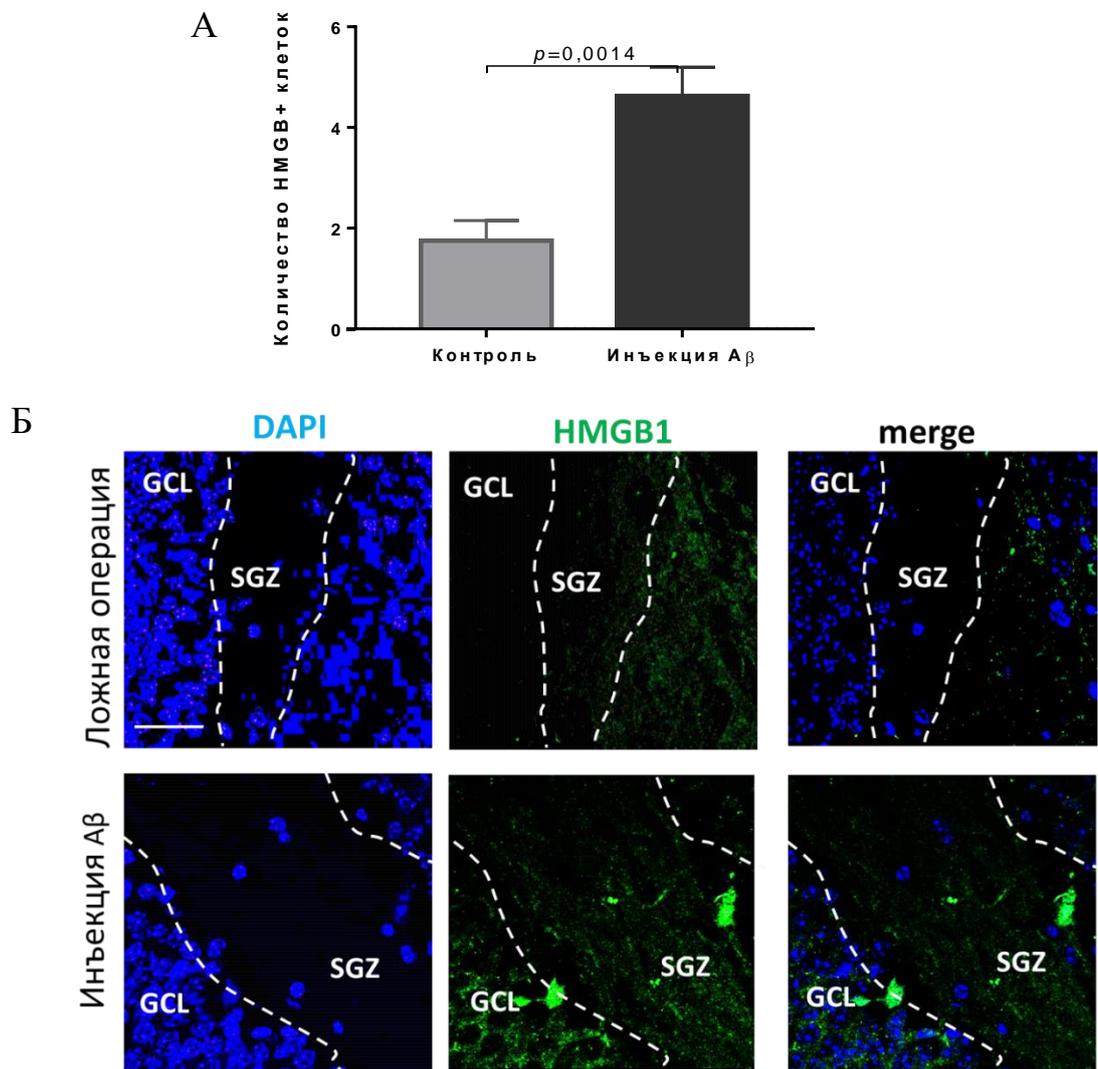


Рисунок 58 – (А) Количество HMGB+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б) – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в группе контроля и после инъекции бета-амилоида. В первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия HMGB (зеленый), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Инъекция A β – внутригиппокампальная инъекция бета-амилоида, ложная операция – введение PBS. Экспрессия HMGB1 в зубчатой извилине гиппокампа. DAPI окрашены ядра. Масштабная шкала – 100 мкм.

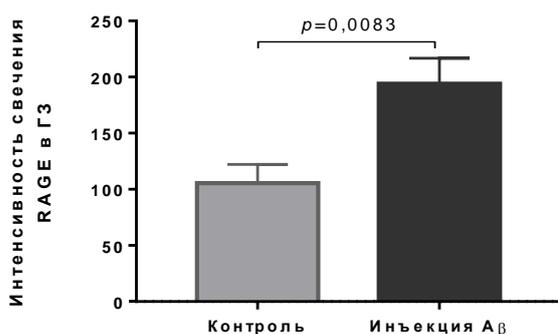
Результаты исследования экспрессии RAGE в эндотелиоцитах при моделировании болезни Альцгеймера

Известно, что рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) является полилигандным рецептором, способным связывать не только конечные продукты гликирования (AGE), но также и пептиды бета-амилоида (A β) [316].

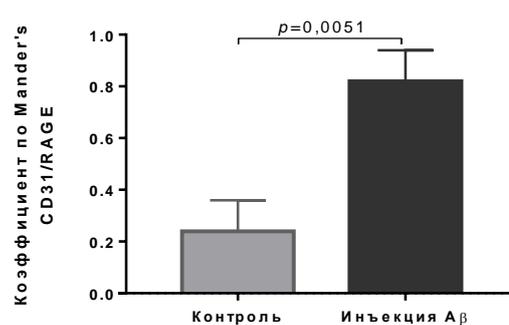
Исследование головного мозга человека выявило более высокие уровни экспрессии RAGE в нейрональных, микроглиальных и эндотелиальных клетках у пациентов с БА. Уровни экспрессии RAGE коррелируют с тяжестью заболевания, наличием амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Однако остается неизвестным как меняется экспрессия RAGE при введении олигомеров бета-амилоида при отсутствии амилоидных отложений [114].

В ходе исследования определена интенсивность экспрессии RAGE в зубчатой извилине. Так получено, что экспрессия RAGE у мышей после введения олигомеров бета-амилоида значимо выше ($194,15 \pm 22,6$) по сравнению с контролем соответствующего возраста ($105,54 \pm 16,7$) ($p=0,0083$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 59). При определении колокализации сигнала RAGE и маркера эндотелиальных клеток CD31 выявлена сильная степень колокализации по высокому коэффициенту по Mander's в группе после введения бета-олигомеров ($0,82 \pm 0,12$), тогда как в группе после проведения ложной операции такой коэффициент составил ($0,24 \pm 0,12$) ($p=0,0051$, критерий Манна-Уитни).

А



Б



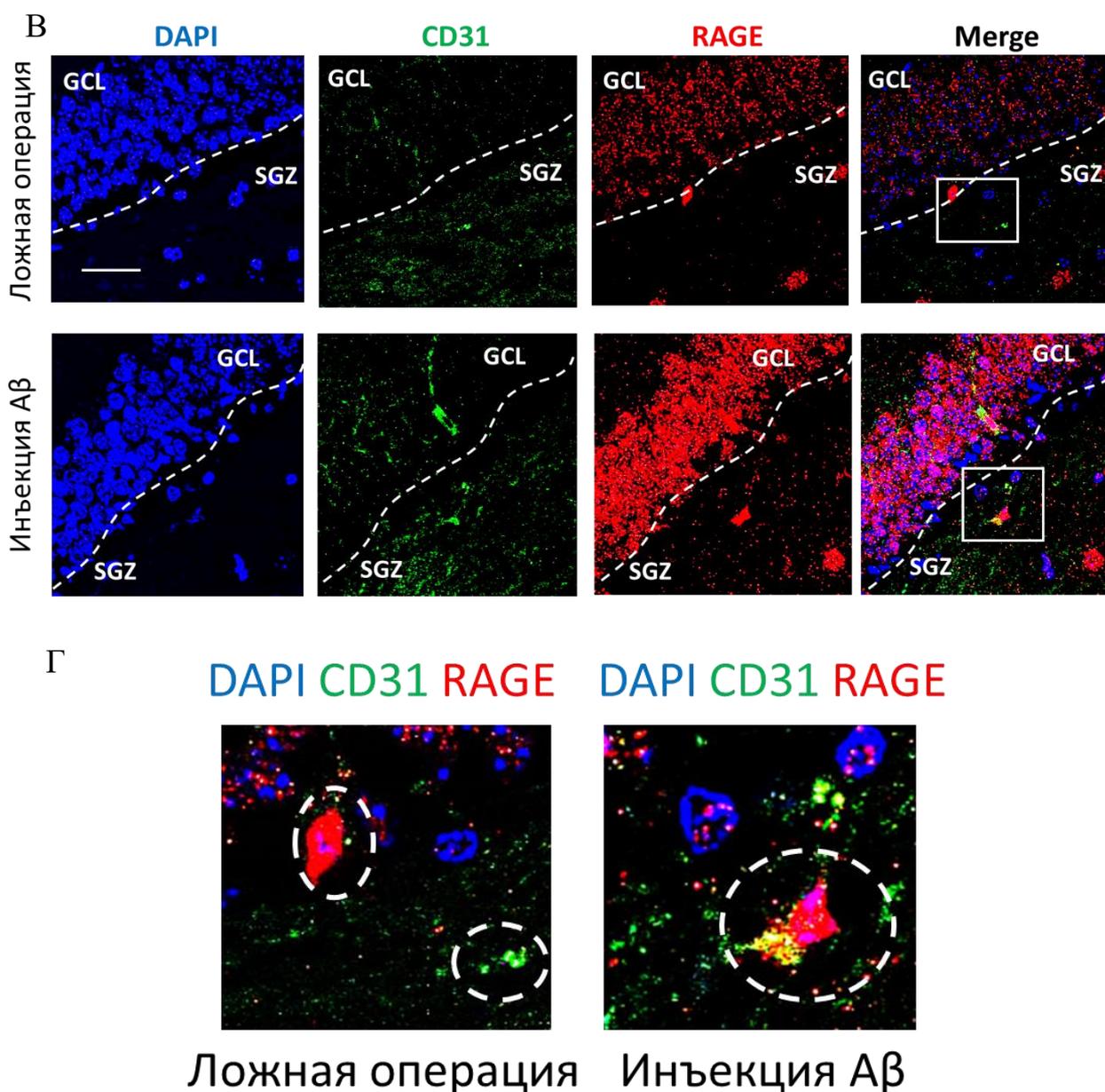


Рисунок 59 – (А) Интенсивность свечения RAGE в зубчатой извилине гиппокампа. (Б) – Коэффициент по Mander's CD31/RAGE. (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия CD31 (зеленый), в третьей колонке – экспрессия RAGE (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100мкм. (Г) – Наложение сигналов DAPI, CD31, RAGE. Инъекция Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-амилоида, ложная операция – введение PBS. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона.

Таким образом, RAGE, экспрессируемый в микрососудах мозга, участвует в развитии болезни Альцгеймера, по всей видимости, усиливая Аβ-транспорт через ГЭБ и стимулируя нейроваскулярное воспаление.

3.5. Изучение роли NLRP3 инфламмасом в процессах нейрогенеза и ангиогенеза, синаптической передачи и формировании астроцитов. Исследование поведенческого фенотипа мышей, не экспрессирующих NLRP3 инфламмасы

3.5.1. Результаты исследований экспрессии маркеров раннего нейрогенеза в гиппокампе мышей, нокаутных по гену *Nlrp3*

В литературе имеются единичные сведения, что ингибирование нейровоспаления путем воздействия на NLRP3 путь приводит к усилению нейрогенеза в субвентрикулярной зоне головного мозга после некоторых патологических состояний [113, 454]. Однако до сих пор остаются неизученными особенности нейрогенеза во взрослом головном мозге при выключении гена *Nlrp3*. В данном эксперименте была оценена экспрессия маркеров раннего нейрогенеза у *Nlrp3*^{-/-} мышей. Так исследована экспрессия маркера Nestin и колокализация Nestin⁺ клеток с маркером радиальной глии (и зрелых астроцитов) – GFAP для идентификации активированных НСК.

Определено, что в гиппокампе животных, нокаутных по гену *Nlrp3*, экспрессируется статистически значимо меньше Nestin⁺ мультипотентных стволовых клеток ($3,1 \pm 0,8$) по сравнению с группой контроля дикого типа ($7,9 \pm 1,4$) ($p=0,0116$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 60). Количество активированных нейрональных стволовых клеток, одновременно колокализующих маркеры Nestin и GFAP, в группе мышей с делецией *Nlrp3* было статистически значимо ниже ($2,25 \pm 0,7$) относительно контрольных мышей ($4,6 \pm 0,8$) ($p=0,0472$, критерий Манна-Уитни).

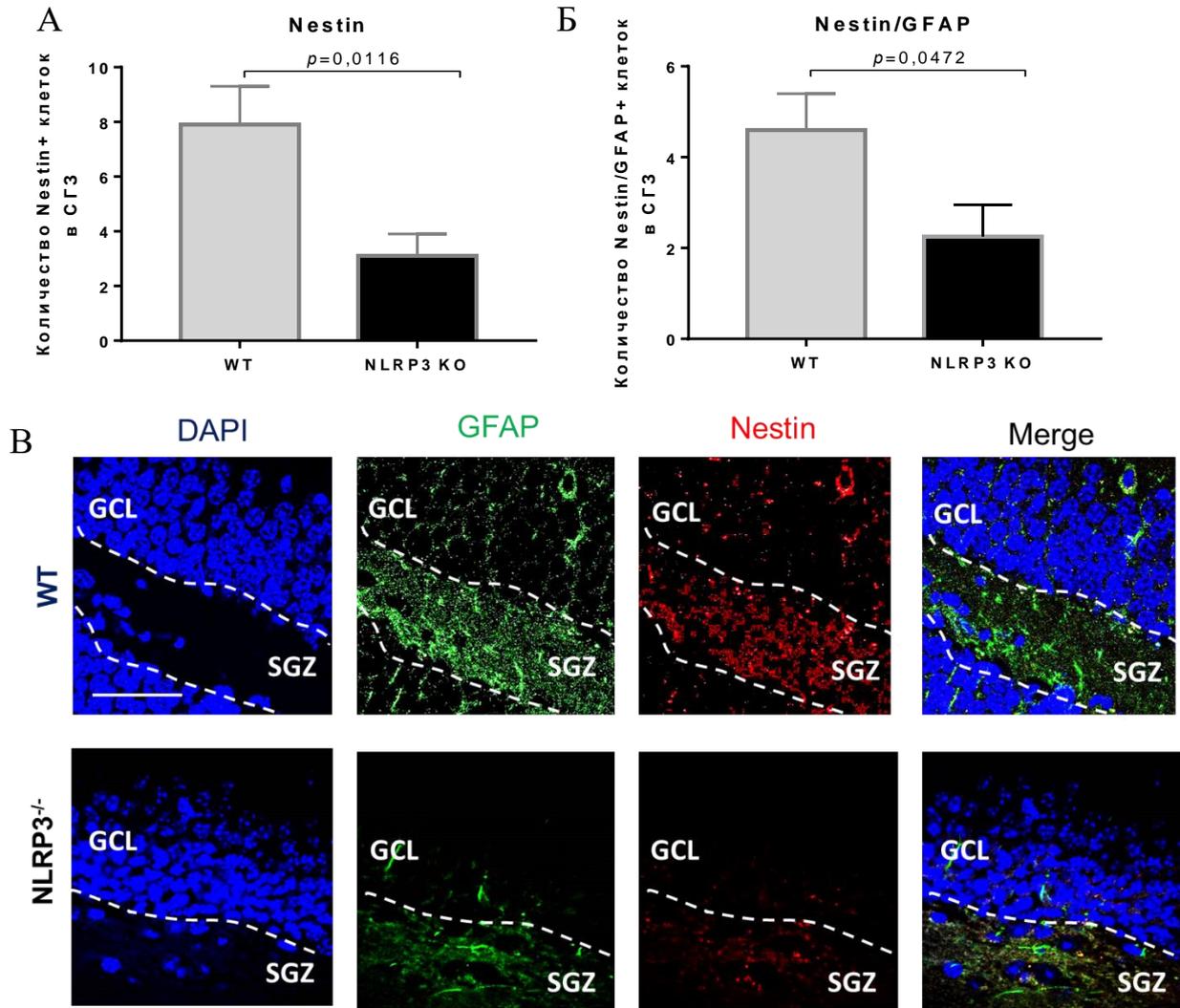


Рисунок 60 – (А) Количество Nestin⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б) – Количество Nestin/GFAP⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия GFAP (зеленый), в третьей колонке – экспрессия Nestin (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона.

В качестве маркера незрелых нейронов и нейробластов был использован даблкортин – DCX [229]. DCX начинает экспрессироваться еще в делящихся нейрональных клетках-предшественниках и сохраняется в течение около 30 дней до созревания клеток и интеграции в зернистый клеточный слой. Было показано, что DCX играет важную роль в миграции нейронов [225].

У животных контрольной группы субгранулярный слой был представлен значительным числом клеток, локализирующих маркер DCX, в то

время как у *Nlrp3*^{-/-} мышей такие клетки были единичными, что указывает на непосредственную роль гена *Nlrp3* в нейрогенезе (Рисунок ИГХ). При количественном подсчете определено, что DCX⁺ клеток у мышей дикого типа статистически значимо больше и составляет $17,9 \pm 2,3$, у *Nlrp3*^{-/-} мышей – $4,6 \pm 1,2$ клеток в поле зрения ($p=0,0003$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 61).

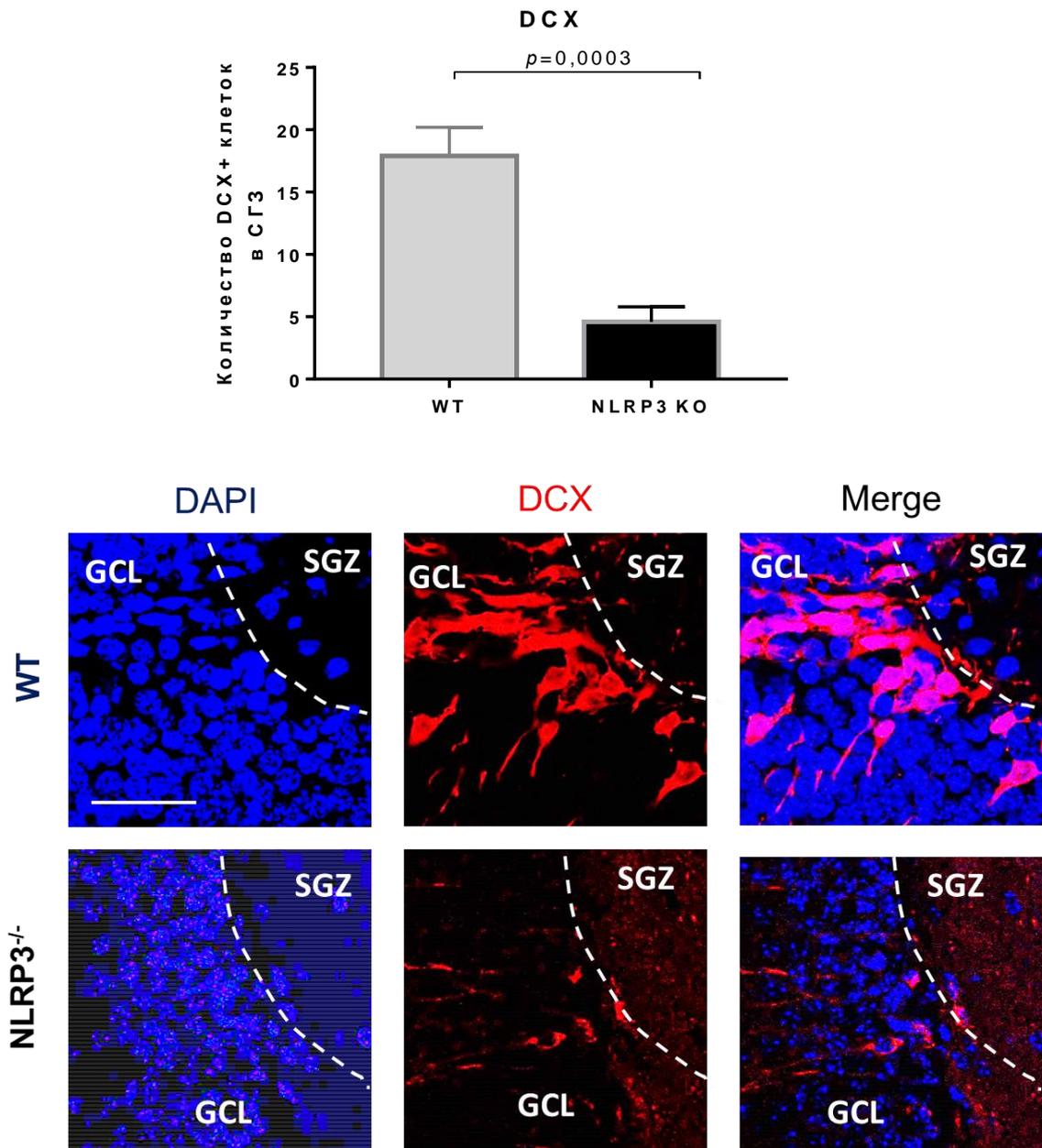


Рисунок 61 – (А) Количество DCX⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б)– Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия DCX (красный), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона.

Так же был изучен еще один маркер нейрогенеза – NeuroD1, который классически считается маркером нейрональной дифференцировки, однако в последнее время была подтверждена его роль в выживании и созревании зрелых нейронов [128]. Практически все зрелые клетки гранулярного слоя зубчатой извилины в контроле экспрессируют NeuroD1, что проявляется высоким коэффициентом перекрытия по Mander's (с маркером зрелых нейронов NeuN) ($0,91 \pm 0,09$) в сравнении с мышами с делецией гена *Nlrp3* ($0,2 \pm 0,09$) ($p=0,0001$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 62).

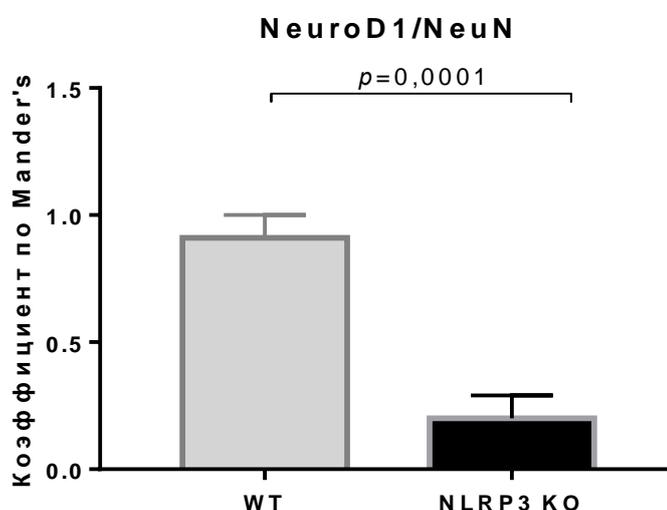


Рисунок 62 – Коэффициент перекрытия по Mander's NeuroD1/NeuN. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

Таким образом, полученные данные исследования разных этапов нейрогенеза позволяют сделать вывод, что NLRP3 инфламмосомы необходимы для нормального уровня нейрогенеза в зубчатой извилине взрослого мозга.

3.5.2. Результаты исследований экспрессии маркеров нейрональной и глиальной природы в гиппокампе мышей, нокаутных по гену *Nlrp3*

При проведении иммуногистохимических исследований с использованием антител против GFAP и конфокальной микроскопии было

зафиксировано, что количество астроцитов было явно снижено у мышей, нокаутных по гену *Nlrp3* (Рисунок 63). Так было подсчитано количество GFAP+ клеток в CA1, CA3 зонах гиппокампа и зубчатой извилине. Количественный анализ показал значительное снижение клеток GFAP в области CA1 у *Nlrp3*^{-/-} мышей ($158,9 \pm 19,81$ клеток / мм²) по сравнению с группой контроля ($272,4 \pm 20,42$ клетки/мм²) ($p = 0,0058$, критерий Манна-Уитни).

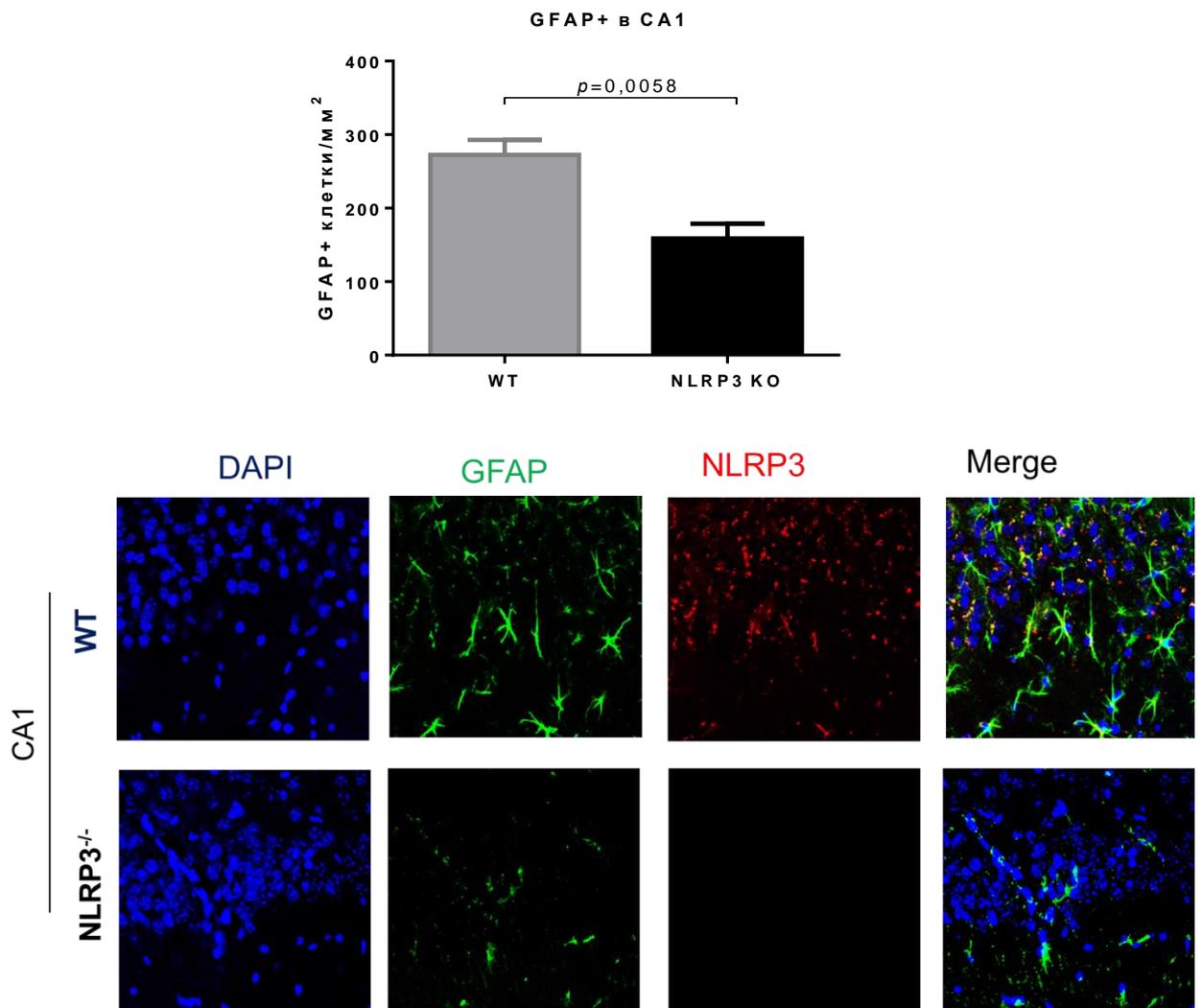


Рисунок 63 – (А) Площадь GFAP+ клеток в мм² в CA1 зоне гиппокампа. (Б) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия GFAP (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3КО – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

В области CA3 у *Nlrp3*^{-/-} мышей также было значительно меньше астроцитов ($132,4 \pm 19,8$ клеток/мм² и $223,2 \pm 21,47$ клеток/мм² для

экспериментальной *Nlrp3*^{-/-} и контрольной группы WT соответственно, $p=0,0216$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 64).

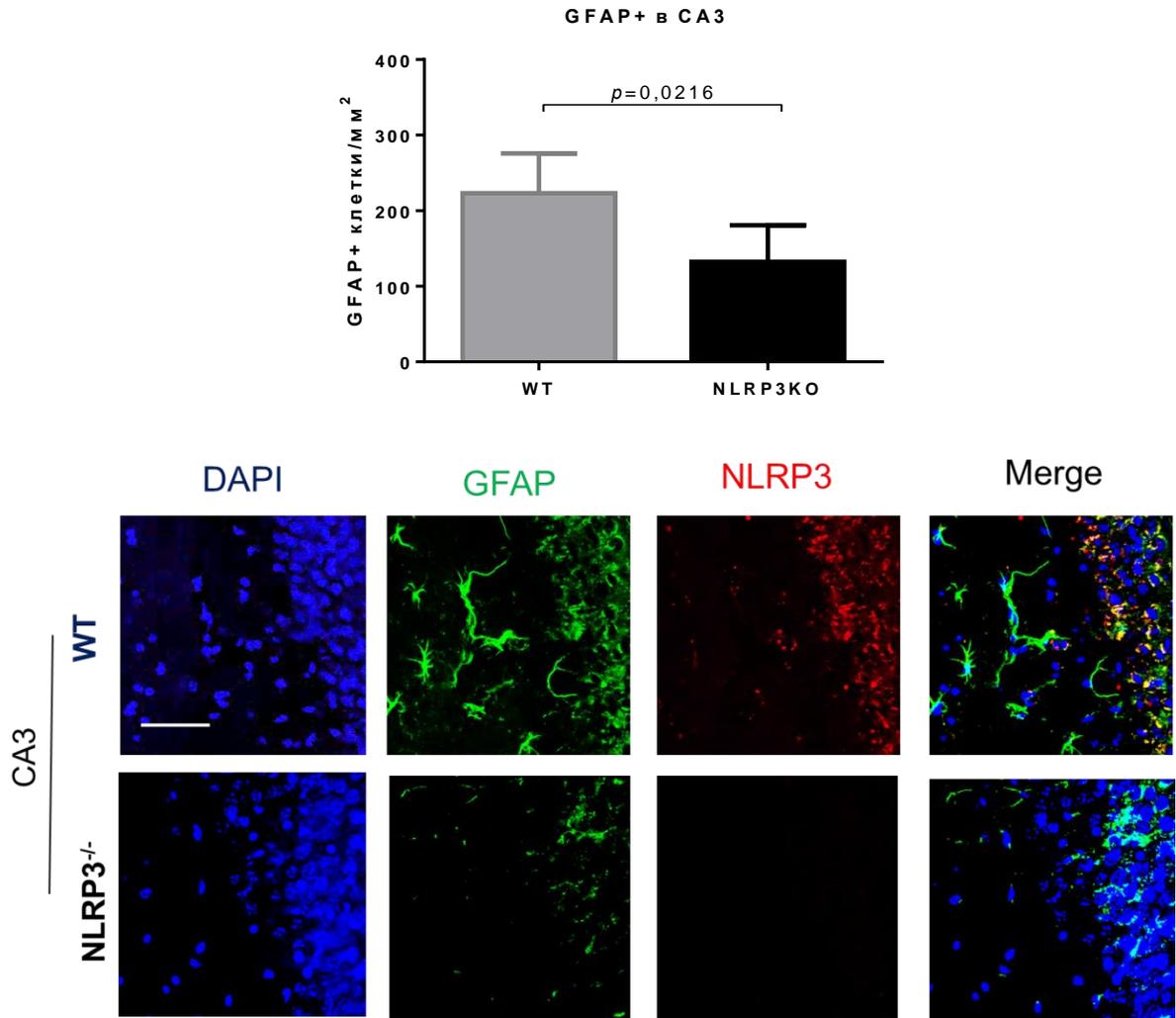


Рисунок 64 – (А) Площадь GFAP+ клеток в мм² в CA3 зоне гиппокампа. (Б) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия GFAP (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

Аналогичные изменения были выявлены в зубчатой извилине гиппокампа – снижение площади, занимаемой GFAP+ астроцитами в группе мышей с нокаутированием гена *Nlrp3* ($106,3\pm 13,64$) по сравнению с группой контроля ($169,7\pm 7,51$) ($p=0,0152$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 65).

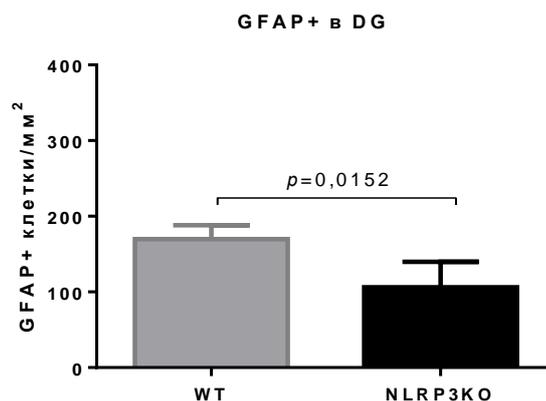


Рисунок 65 – Площадь GFAP+ клеток в мм² в зубчатой извилине (DG) гиппокампа. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

Мы также наблюдали, что морфология астроцитов в головном мозге была существенно изменена у мышей, нокаутированных по гену *Nlrp3*. Качественный анализ выявил меньшее количество астроцитарных отростков, исходящих из тела клетки в экспериментальной группе *Nlrp3*^{-/-} мышей по сравнению с контрольной группой. Длина ветвления в астроцитах у *Nlrp3*^{-/-} мышей была меньше по сравнению с контрольными мышами дикого типа. Было показано, что астроциты в областях CA1, CA3 и зубчатой извилины гиппокампа у мышей, нокаутированных по гену *Nlrp3*, демонстрируют сходные изменения в морфологии.

Таким образом, делеция гена *Nlrp3* приводит к сокращению астроцитов и изменению их морфологии в гиппокампе.

Кроме того, в данном блоке экспериментов была исследована экспрессия NLRP3 *in vivo* на нейрональных и астроглиальных клетках с помощью иммуногистохимии с антителами против NLRP3 и NeuN или NLRP3 и GFAP для обнаружения зрелых нейронов и астроцитов соответственно. Экспрессия NLRP3 была обнаружена по всему гиппокампу в областях CA1, CA3 и зубчатой извилины. Было подтверждено, что у *Nlrp3*^{-/-} мышей не было экспрессии NLRP3 в исследуемых зонах головного мозга. Наблюдалась повсеместная экспрессия NLRP3 инфламмасом в мозге мыши в нейронах и астроцитах с высокой интенсивностью в пирамидальных нейронах CA1 и CA3

гиппокампа и в зубчатой извилине. Был определен коэффициент колокализации путем определения коэффициента перекрытия по Mander's. У животных дикого типа коэффициента перекрытия по Mander's для NeuN и NLRP3 варьировался от 0,42 до 0,64 в гиппокампе, что указывает на положительную колокализацию маркера воспаления в нейронах гиппокампа. Интересно, что астроциты также экспрессируют инфламмосомы в контрольной группе, но диапазон коэффициента перекрытия по Mander's составляет от 0,26 до 0,33 в гиппокампе. Эти данные показывают, что во взрослом мозге мышей WT анти-NLRP3 иммунореактивность в основном локализуется в постмитотических нейронах в областях CA1, CA3 и DG.

Таким образом, было продемонстрировано, что NLRP3 инфламмосомы экспрессируются как в глиальных, так и в нейрональных клетках у контрольных мышей.

3.5.3. Результаты исследований экспрессии маркера ангиогенеза (VEGF) в гиппокампе мышей, нокаутных по гену *Nlrp3*

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) представляет собой ангиогенный белок с нейротрофическим и нейропротекторным действием. Нейрогенез в SGZ во взрослом мозге происходит в тесной связи с ангиогенезом, предполагая, что общие факторы, такие как VEGF, могут быть вовлечены в оба процесса [192].

В связи с этим был исследован маркер VEGF в колокализации с маркером выживаемости и созревании зрелых нейронов NeuoD1. Выявлены статистически значимые различия в экспрессии VEGF в контроле и у мышей, нокаутных по гену *Nlrp3*, а именно у мышей дикого типа экспрессия VEGF значительно больше ($11,2 \pm 3,1$), чем у *Nlrp3*^{-/-} мышей ($3,4 \pm 1,4$) ($p=0,0407$, критерий Манна-Уитни). Тем не менее при изучении колокализации двух маркеров VEGF и NeuoD1 выявлен интересный факт совместной локализации этих маркеров у *Nlrp3*^{-/-} мышей ($0,95 \pm 0,05$), в то время как в контрольной

группе эти маркеры практически не перекрываются ($0,12 \pm 0,12$) ($p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 66).

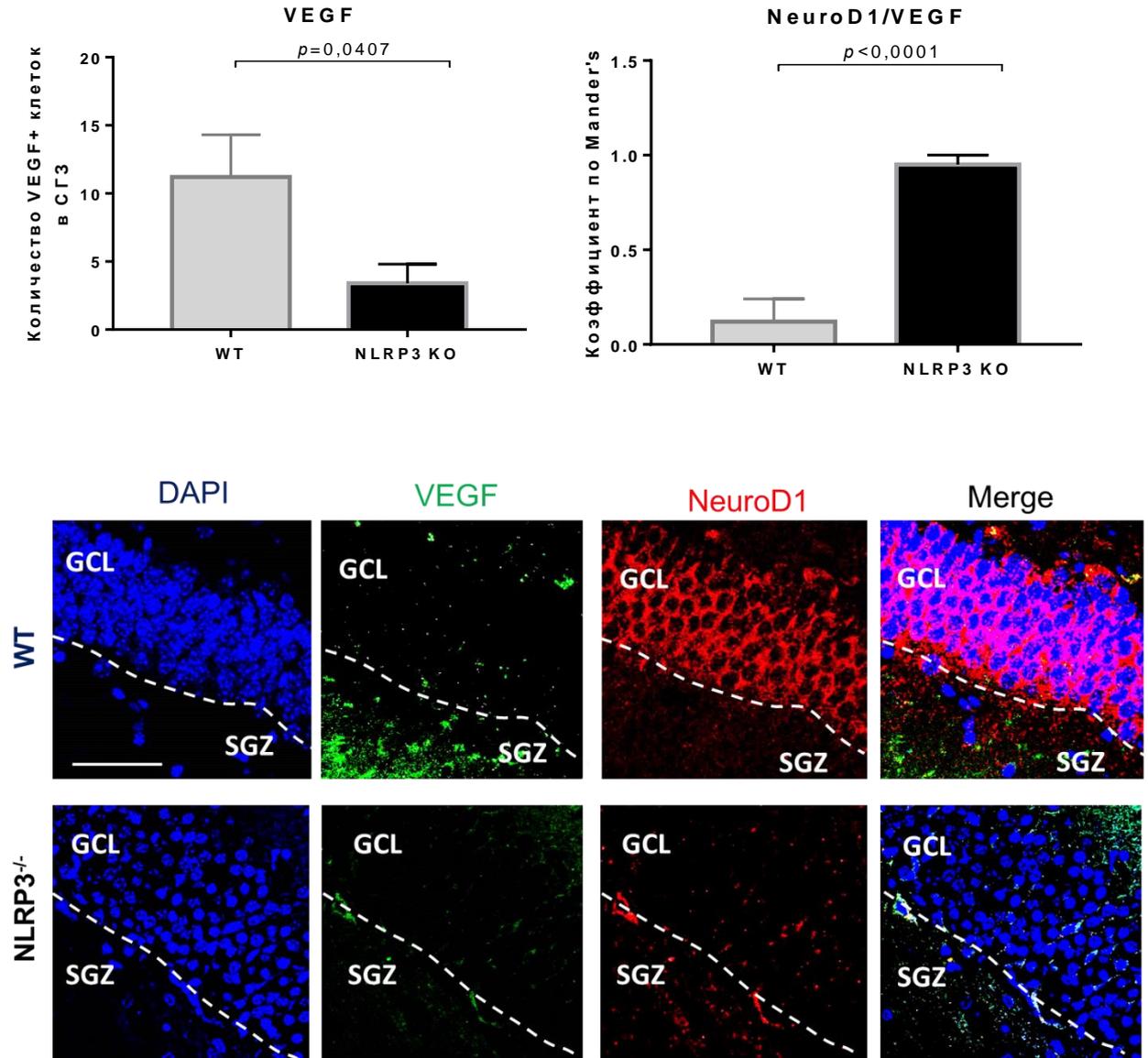


Рисунок 66 – (А) Количество VEGF⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б) – Коэффициент перекрытия по Mander's NeuroD1/VEGF⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия VEGF (зеленый), в третьей колонке – экспрессия NeuroD1 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона.

Следовательно, можно заключить, что в отсутствии NLRP3 инфламмасом происходит снижение не только основных маркеров

нейрогенеза, отображающих интенсивность данного процесса, но и маркера ангиогенеза.

3.5.4. Результаты записи локальных возбуждающих полевых постсинаптических потенциалов (локальных пВПСП)

До настоящего времени патологических изменений в синаптической передаче между нейронами головного мозга у NLRP3 KO модельных мышей не было описано. Нейрофизиологический метод был использован для оценки активности нейронов гиппокампа. Для оценки активности нейронов гиппокампа были применены электрофизиологические методы с записью пВПСП с живых срезов, полученных от самцов мышей контрольной линии C57Bl6 и нокаутных по гену *Nlrp3*. Локальные возбуждающие полевые постсинаптические потенциалы представляют собой надежную и стабильную запись возбуждающей синаптической передачи [375].

Было выявлено, что амплитуды fEPSP, вызванные активацией коллатералей Шаффера в аксонах пирамидных клеток зоны CA1 были значительно меньше у *Nlrp3*^{-/-} мышей в сравнении с мышами контрольной группы ($1,9 \pm 0,3$ мВ у *Nlrp3*^{-/-} мышей и $3,0 \pm 0,4$ мВ у контрольной группы, $p=0,0369$) (Рисунок 67).

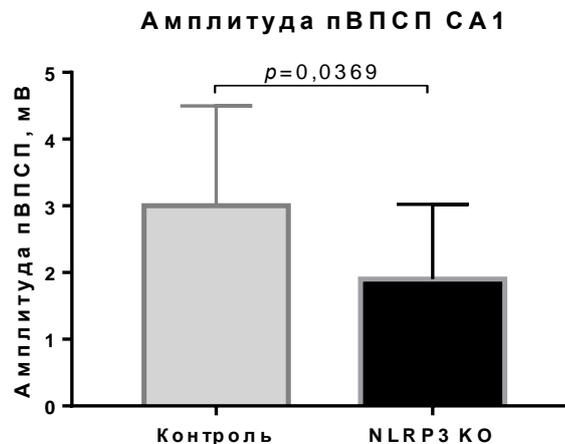


Рисунок 67 – Амплитуда локальных возбуждающих полевых постсинаптических потенциалов CA1 зоны гиппокампа.

Также незначительное увеличение времени подъёма и времени спада амплитуды пВПСП наблюдалось у *Nlrp3*^{-/-} мышей без статистически значимого отличия от данных показателей у мышей дикого типа (Таблица 6).

Группы	Время подъёма (мсек)	Время спада (мсек)
WT ♂	0,7±0,1	2,1±0,3
NLRP3 KO ♂	0,8±0,1	3,0±0,5

Таблица 6 – Нарушение транссинаптической передачи в пирамидных нейронах зоны CA1 гиппокампа у NLRP3KO мышей.

Схожие результаты были получены при записи пВПСП, вызванные активацией коллатералей Шаффера в аксонах пирамидных клеток зоны CA3 гиппокампа у мышей с нокаутированием гена *Nlrp3* и мышей контрольной группы. У *Nlrp3*^{-/-} мышей отмечалось незначительное уменьшение амплитуды пВПСП и увеличение время её спада, однако время подъёма амплитуды оказалось значительно длиннее в сравнении с таковым показателем у мышей дикого типа. Время нарастания амплитуд пВПСП, вызванных активацией коллатералей Шаффера в аксонах пирамидных клеток зоны CA3, было значительно больше у *Nlrp3*^{-/-} мышей в сравнении с мышами дикого типа (0,8±0,1 мсек и 0,5±0,1 мсек соответственно, $p=0,0059$), что может отражать замедленное высвобождение нейромедиатора из пресинапса (Рисунок 68). Данные результаты свидетельствуют о суммарной сниженной активности пирамидных нейронов гиппокампа, более выраженное в CA1 зоне, и о затруднении выделения нейромедиатора из пресинаптических терминалей в синапсах, больше выраженное в CA3 зоне, у *Nlrp3*^{-/-} мышей.

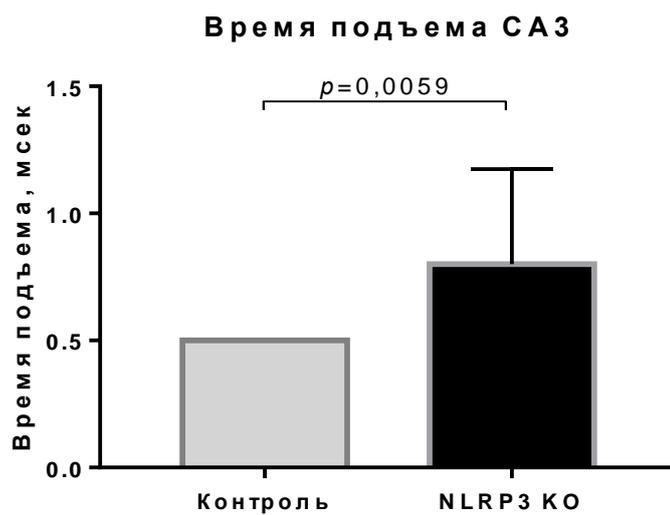


Рисунок 68 – Время нарастания амплитуд пВПСП СА3 зоны гиппокампа.

3.6. Исследование роли NLRP3 в трансинаптической передаче в норме и при моделировании болезни Альцгеймера. Влияние NLRP3 инфламмасом на метаболизм глюкозы

3.6.1. Результаты определения лактата и IL-1 β и методом иммуноферментного анализа у мышей, нокаутных по гену *Nlrp3* с инъекцией растворимых форм бета-олигомеров

В данном блоке исследования была определена концентрация продукта метаболизма глюкозы – лактата в гиппокампе методом иммуноферментного анализа.

Лактат, входящий в активированные синапсы, играет метаболическую роль, в соответствии с высокими потребностями в энергии мембранных и клеточных процессов, необходимых для долговременной синаптической пластичности и памяти, которые включают, в том числе цитоскелетные ремоделирования, транспорт рецепторов, локальную трансляции мРНК. Помимо своей роли в качестве метаболита и энергетического субстрата, лактат является сигналом для изменения соотношения NADH/NAD⁺ и, следовательно, участвует в окислительно-восстановительном регулировании – механизме важном для пластичности и памяти. Было сообщено, что применение лактата увеличивает внутриклеточный уровень NADH, способствуя экспрессии генов, связанных с пластичностью, и потенцирует передачу сигналов через NMDA-рецепторы. Имеются данные, что лактат наряду с другими глиотрансммиттерами необходим для консолидации памяти [444].

Так был определен уровень лактата у животных контрольной группы и у *Nlrp3* нокаутных мышей с введением олигомеров бета-амилоида и проведением ложной операции (Рисунок 69). Выявлено статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (*операции* и *генотипа*) ($F(1,24)=23,3$, $p<0,0001$), а также влияние фактора *операции* ($F(1,24)=55,87$,

$p < 0,0001$). При множественном сравнении групп между собой выявлены статистически значимые различия между группами, а именно более низкий уровень лактата в группе *Nlrp3*^{-/-} мышей с введением PBS ($22,2 \pm 3,2$) по сравнению с контрольными мышами с аналогичной операцией ($32,54 \pm 0,98$) ($p = 0,0022$, Tukey's критерий). Также уровень лактата снижался у мышей дикого типа (контрольных) после инъекции им растворимых форм бета-олигомеров ($6,35 \pm 0,71$) в сравнении с ложно-оперированными мышами ($32,54 \pm 0,98$) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий). Мыши с разными генотипами *Nlrp3*^{-/-} и *Nlrp3*^{+/+} с введением A β 1-42 также имели различный уровень лактата ($17,04 \pm 1,3$ и $6,35 \pm 0,71$, соответственно) ($p = 0,0016$, Tukey's критерий). При этом важно отметить, что введение бета-олигомеров *Nlrp3*^{-/-} мышам не влияет на уровень лактата, так как не выявлена разница при сравнении с группой *Nlrp3*^{-/-} мышей с проведением ложной операции ($p = 0,2135$).

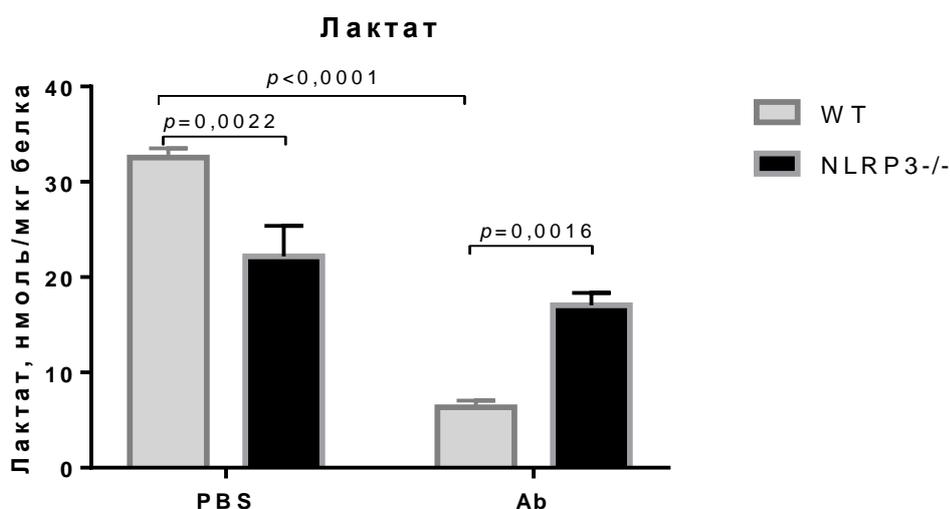


Рисунок 69 – Определение уровня лактата в гомогенатах гиппокампа. *Nlrp3*^{-/-} – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*. Ab – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

Таким образом, в данном исследовании наблюдается снижение уровня лактата у контрольных мышей после введения им олигомеров бета-амилоида, сниженный уровень лактата у *Nlrp3*^{-/-} мышей, однако обнаружено, что инъекция A β 1-42 таким мышам не приводит к изменению концентрации лактата в гомогенатах гиппокампа.

При исследовании уровня IL1beta во всех группах *Nlrp3* нокаутных животных были определены следовые количества IL1beta, что подтверждает отсутствие активности NLRP3 инфламмасом вне зависимости от введения бета-олигомеров (Рисунок 70). Выявлено статистически достоверное влияние взаимодействия двух факторов *операции* и *генотипа* ($F(1,21)=7,787, p=0,0110$), а также влияние двух факторов по отдельности: *операции* ($F(1,21)=8,422, p=0,0085$), *генотипа* ($F(1,21)=47,01, p<0,0001$). При множественном сравнении групп между собой выявлен высокий уровень интрелейкина 1 бета при моделировании болезни Альцгеймера у животных дикого типа ($33,77\pm 5,7$ пг/мг белка) в сравнении с ложно-оперированными мышами ($15,04\pm 2,65$ пг/мг белка) ($p=0,0018$).

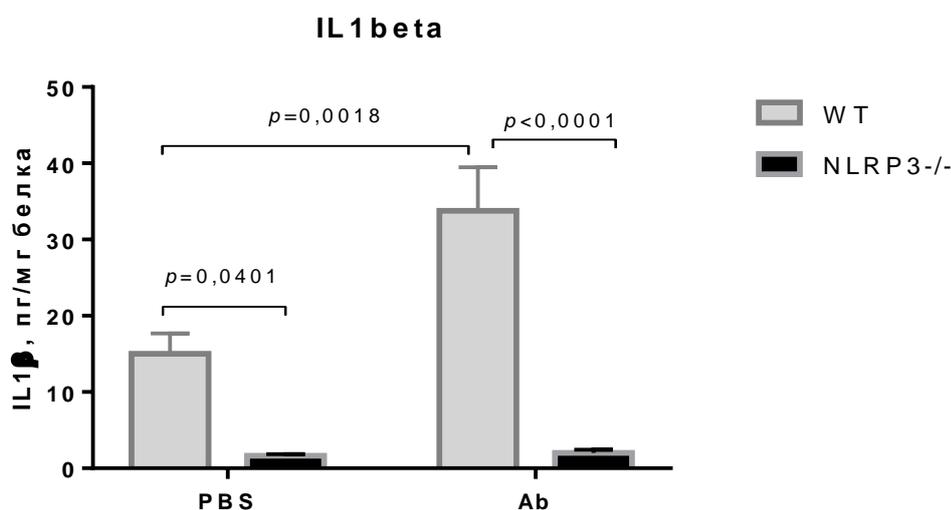


Рисунок 70 – Определение уровня интерлейкина 1β в гомогенатах гиппокампа. *Nlrp3^{-/-}* – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*. Ab – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

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 гиппокампе головного мозга, что в конечном итоге может приводить к нарушению процессов синаптогенеза и нейрогенеза, ассоциированных с репарацией или реализацией когнитивных функций.

3.6.2. Результаты исследования трансинаптической передачи у *Nlrp3*^{-/-} мышей с введением растворимых форм бета-олигомеров

Для изучения влияния бета-амилоида и роли NLRP3 инфламмасом на передачу электрофизиологического сигнала проводили изучение трансинаптической передачи у *Nlrp3*^{-/-} мышей после введения A β 1-42. В качестве контроля использовали мышей с введением PBS. Для выявления значимого эффекта влияния типа операции (A β или PBS), а также роли непосредственно инфламмасом использовали мышей дикого типа C57B16 и *Nlrp3*^{-/-} с разными операциями.

Так не было выявлено влияние генотипа (*Nlrp3*^{-/-} или *Nlrp3*^{+/+}) и операции (A β или PBS) на локальный пВПСП в CA1 зоне (Рисунок 71).

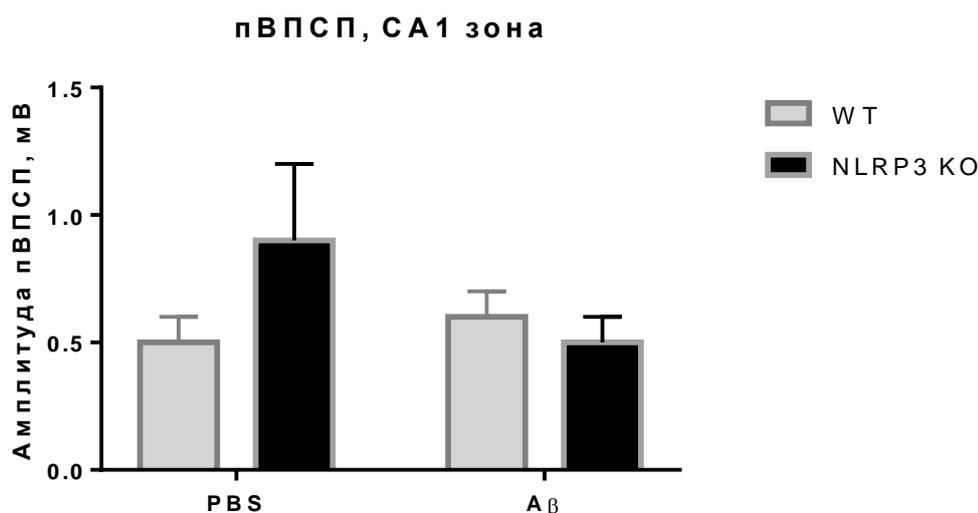


Рисунок 71 – Амплитуда локальных возбуждающих полевых синаптических потенциалов (пВПСП) в CA1 зоне. *Nlrp3*^{-/-} – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*, WT – контрольные мыши дикого типа. A β – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

На время нарастания амплитуды пВПСП влияет *операция* ($F(1,32)=8,67$, $p=0,0060$, двухфакторный дисперсионный анализ), а также генотип ($F(1,32)=10,83$, $p=0,0024$, двухфакторный дисперсионный анализ). При множественном сравнении выявлено увеличение времени нарастания амплитуды пВПСП в CA1 зоне у *Nlrp3*^{-/-} мышей после введения PBS по

сравнению с группой мышей дикого типа со схожей операцией, однако данные наблюдения были статистически не значимы ($p=0,1912$) (Рисунок 72).

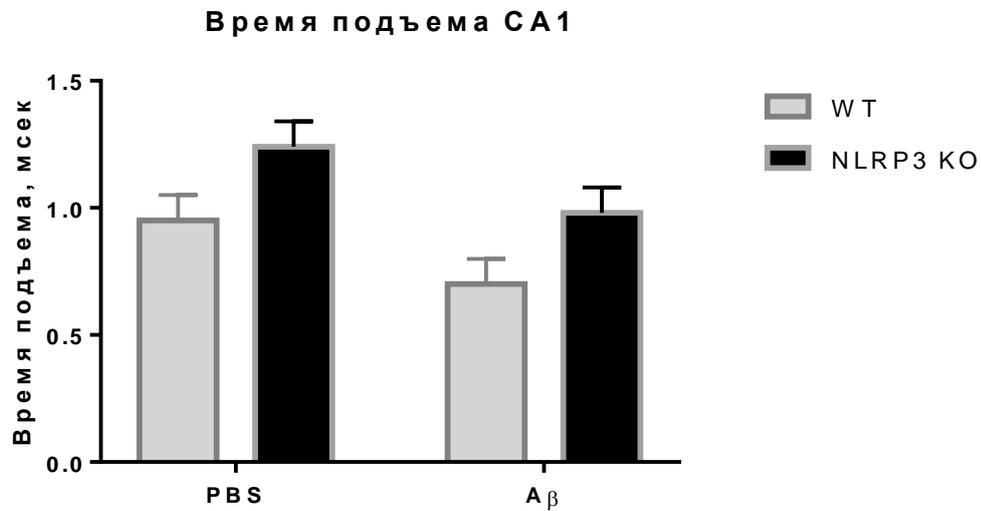


Рисунок 72 – Время подъема амплитуды локальных возбуждающих полевых синаптических потенциалов (пВПСП) в СА1 зоне. *Nlrp3^{-/-}* – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*, WT – контрольные мыши дикого типа. Aβ – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

Интересен тот факт, что несмотря на действие растворимых форм бета-амилоида на мышей *Nlrp3^{-/-}* генотип обладает протекторным эффектом – происходит ретракция до показателей животных контрольной группы времени нарастания амплитуд пВПСП в пирамидных нейронах СА1 зоны ($1,0 \pm 0,1$ мсек в группе *Nlrp3^{-/-}* мышей с введением Aβ1-42; $1,0 \pm 0,1$ мсек в группе контроля с введением PBS; $1,2 \pm 0,1$ мсек в группе *Nlrp3^{-/-}* с введением PBS). При определении времени спада амплитуды пВПСП выявлено статистически значимое влияние операции ($F(1,32)=4,592$, $p=0,0398$, двухфакторный дисперсионный анализ) (Рисунок 73).

Вместе с тем выявлено значимое влияние взаимодействия двух факторов – *генотипа* и *операции* на локальный пВПСП в СА3 ($F(1,32)=5,333$, $p=0,0275$, двухфакторный дисперсионный анализ) (Рисунок 74).

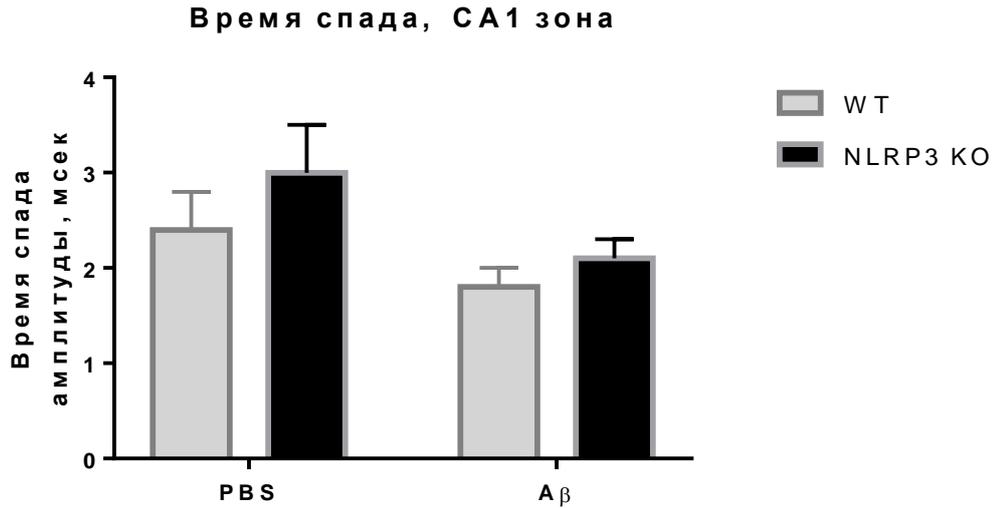


Рисунок 73 – Время спада амплитуды локальных возбуждающих полевых синаптических потенциалов (пВПСП) в СА1 зоне. *Nlrp3^{-/-}* – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*, WT – контрольные мыши дикого типа. Aβ – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

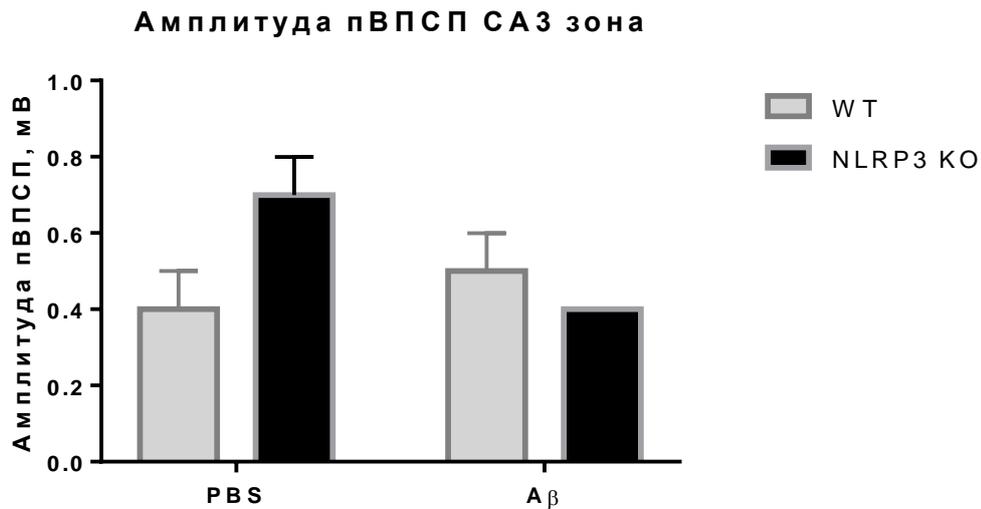


Рисунок 74 – Амплитуда локальных возбуждающих полевых синаптических потенциалов (пВПСП) в СА3 зоне. *Nlrp3^{-/-}* – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*, WT – контрольные мыши дикого типа. Aβ – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

Отметили статистически значимое влияние также взаимодействия двух факторов – *генотипа* и *операции* на время спада амплитуды пВПСП в СА3 ($F(1,32)=14,45$, $p=0,0006$, двухфакторный дисперсионный анализ). При множественном сравнении с использованием Tukey's критерия выявлено увеличение времени спада амплитуды пВПСП в группе животных *Nlrp3^{-/-}* с введением PBS ($3,0\pm 0,3$ мсек) в сравнении с контрольными мышами после

проведения ложной операции ($2,0 \pm 0,1$ мсек ($p=0,0171$)). Однако *Nlrp3*^{-/-} генотип является протекторным, что проявляется снижением времени спада амплитуды пВПСП после введения олигомеров бета-амилоида ($1,8 \pm 0,1$ мсек) в сравнении с *Nlrp3*^{-/-} после введения PBS ($3,0 \pm 0,3$ мсек) ($p=0,0033$) (Рисунок 75).

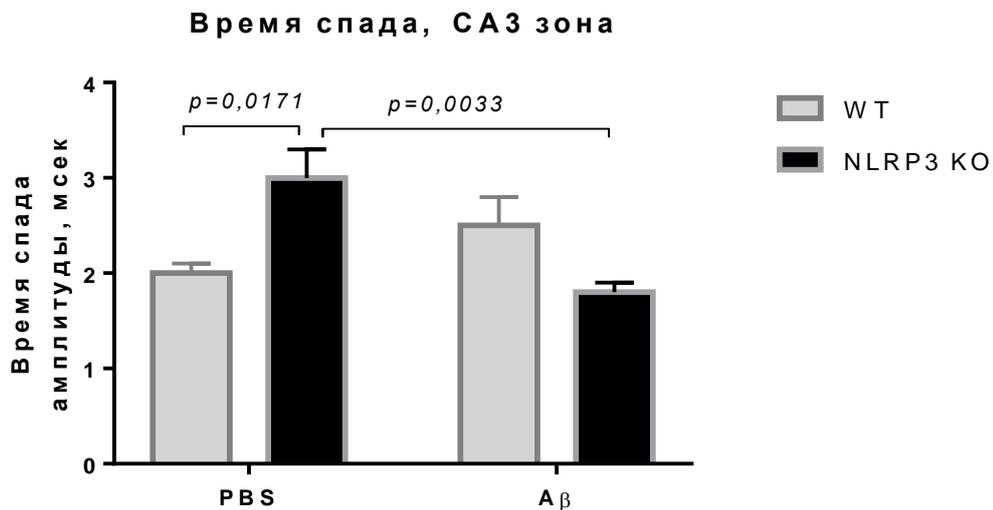


Рисунок 75 – Время спада амплитуды локальных возбуждающих полевых синаптических потенциалов (пВПСП) в СА3 зоне. *Nlrp3*^{-/-} – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*, WT – контрольные мыши дикого типа. Aβ – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

Таким образом, в данном эксперименте подтверждено, что у мышей, нокаутированных по гену *Nlrp3* сила возбуждающей синаптической передачи слабее, а также наблюдается более продолжительная элиминация нейромедиатора из синаптической щели.

Полученные данные свидетельствуют об умеренном нарушении транссинаптической передачи нейронов гиппокампа у *Nlrp3*^{-/-}. Эти нарушения связаны с увеличением возбудимости нейронов СА3 зоны гиппокампа. *Nlrp3*^{-/-} генотип обладает протекторным действием на пирамидные нейроны гиппокампа при введении бета-олигомеров в гиппокамп, в виде уменьшения возбудимости и ускорения высвобождения нейромедиатора до нормальных значений, полученных от животных WT.

3.7. Изучение роли эндогенного газового транмиттера H₂S, продуцируемого эндотелиоцитами, в процессах раннего нейрогенеза, формировании клеток астроглиальной природы и экспрессии NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина

3.7.1. Результаты исследования маркеров раннего нейрогенеза и клеток астроглиальной природы у мышей, нокаутных по гену *CSE*

Синаптическая дисфункция и сосудистое воспаление играют решающую роль в патогенезе БА. Недавний анализ экспрессии мРНК и синаптических белков у самцов мышей дикого типа C57BL/6J ясно продемонстрировал, что индуцированные гомоцистеином плазмы изменения в процессах обучения и памяти были связаны с синаптическим ремоделированием и возможно, воспалением, в гиппокампе. Таким образом, H₂S может влиять на синаптическое ремоделирование. В связи с этим установлено, что H₂S модулирует процессы в гиппокампе и может лежать в основе изменений у пациентов с сосудистой и альцгеймеровской деменцией [213].

Также в одном из исследований было показано, что сероводород способствует пролиферации и нейрональной дифференцировке нервных стволовых клеток [252].

В данном исследовании были определены маркеры раннего этапа нейрогенеза – мультипотентных стволовых клеток Nestin, маркер радиальной глии и зрелых астроцитов – GFAP, а также колокализация данных маркеров для идентификации активированных НСК.

Так было выявлено, что в гиппокампе животных, нокаутных по гену *CSE*, экспрессируется статистически значимо меньше мультипотентных стволовых клеток ($4,1 \pm 0,9$) по сравнению с группой контроля дикого типа ($8,2 \pm 1,3$) ($p=0,0235$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 76).

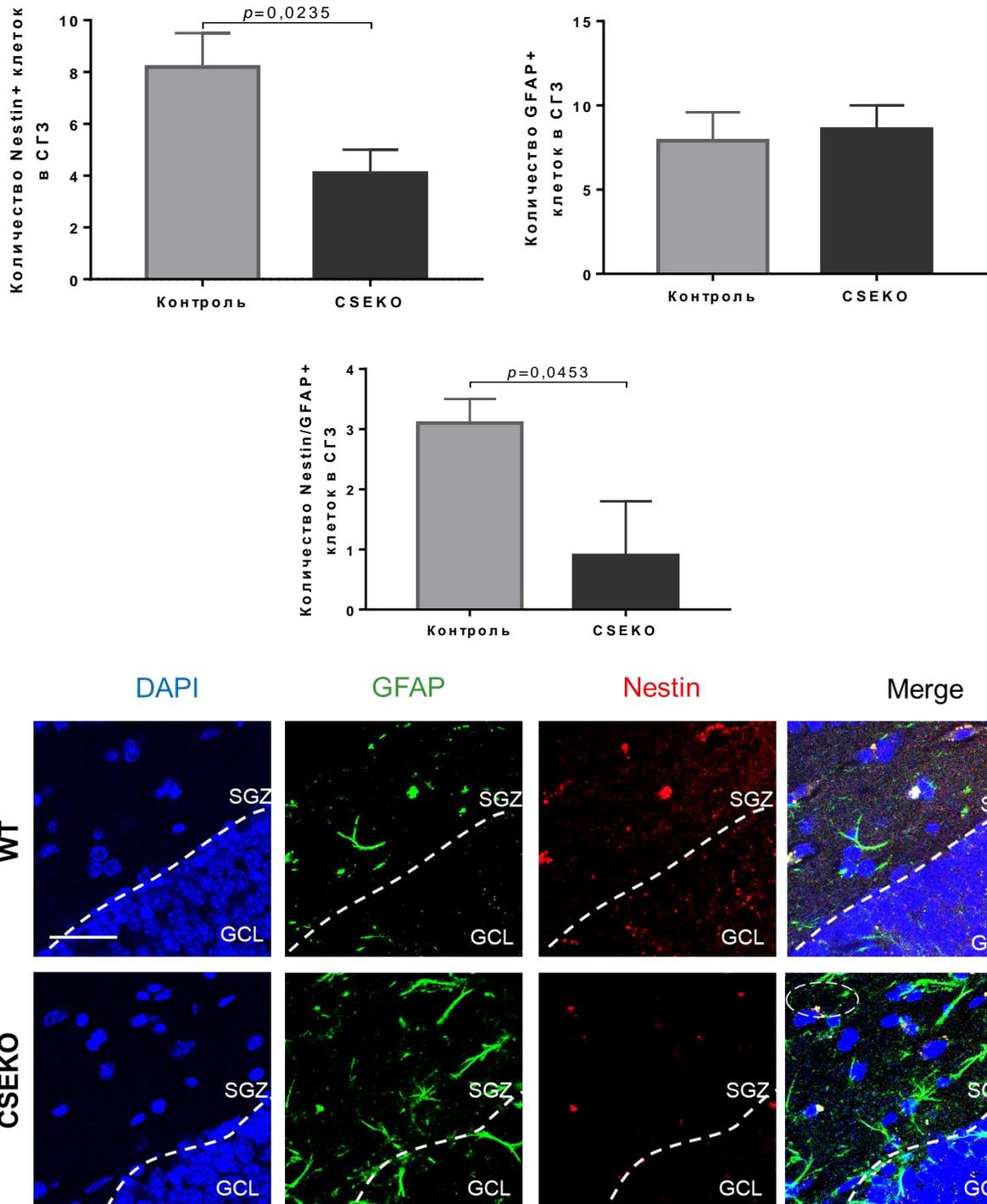


Рисунок 76 – (А) Количество Nestin+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б) – Количество GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (В) – Количество Nestin/GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа (Г) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия GFAP (зеленый), в третьей колонке – экспрессия Nestin (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала 100 мкм.

При этом количество GFAP+ астроцитов не отличалось между группами контроля и *CSE*^{-/-} мышами (7,9±1,7 и 8,6±1,4 соответственно, $p=0,7561$). Вместе с тем, количество активированных нейрональных стволовых клеток, одновременно колокализующих маркеры Nestin и GFAP, в группе мышей с делецией *CSE* было статистически значимо ниже (0,9±0,9) относительно контрольных мышей (3,1±0,4) ($p=0,0453$, критерий Манна-Уитни).

Таким образом, можно заключить, что *CSE* и продуцируемых им H_2S необходим для ранних процессов нейрогенеза, что проявляется снижением числа НСК в группе мышей с нокаутированием гена *CSE*.

3.7.2. Результаты исследования NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина IL1 β у мышей, нокаутных по гену *CSE*

Известно, что воспалительные реакции макрофагов, микроглии и астроцитов способствуют прогрессированию болезни Альцгеймера, однако роль ферментов CBS, *CSE*, MST и CAT в развитии болезни Альцгеймера, а также в процессах нейрогенеза до сих пор не объяснена, и прямых данных, подтверждающих потенциальные преимущества H_2S в качестве терапевтической стратегии этого заболевания нет [213].

В исследовании была определена экспрессия маркеров воспаления: NLRP3 инфламмасом и провоспалительного интерлейкина IL1 β , продукта активности NLRP3 инфламмасом. Выявлено значительное увеличение числа клеток, одновременно локализирующих NLRP3/IL1 β , что проявлялось увеличением коэффициента перекрытия по Mander's в группе *CSE*^{-/-} (0,87±0,1), в то время как в группе контроля данный показатель был 0,29±0,1 ($p=0,0193$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 77).

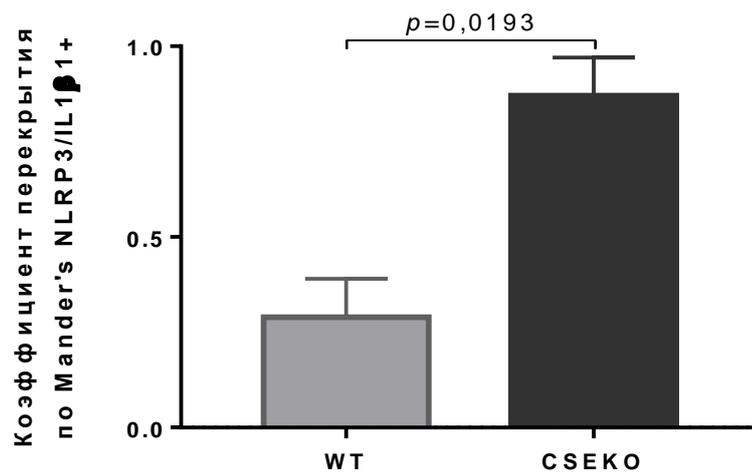


Рисунок 77 – (А) Коэффициент перекрытия по Mander's NLRP3/IL1β. WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*.

В связи с этим справедливо заметить, что делеция гена *CSE* приводит к увеличению экспрессии маркеров воспаления.

3.8. Исследование роли рецепторов конечных продуктов гликирования белков (RAGE) в процессах нейрогенеза

Результаты исследования маркеров раннего нейрогенеза у мышей с делецией гена *RAGE*

Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) является полилигандным рецептором, способным связывать не только конечные продукты гликирования (AGE), но также и пептиды бета-амилоида ($A\beta$). Обычно RAGE экспрессируется на низком базальном уровне во многих тканях взрослого человека, но его активация вызывает положительную обратную связь, способствующую его экспрессии и усиливающую клеточные ответы. Из-за дисбаланса окислительно-восстановительного состояния активация RAGE участвует в возникновении и прогрессировании провоспалительных или проапоптотических клеточных реакций. Однако в последнее время была продемонстрирована роль RAGE в физиологических процессах, таких как, например, дифференцировка клеток [114].

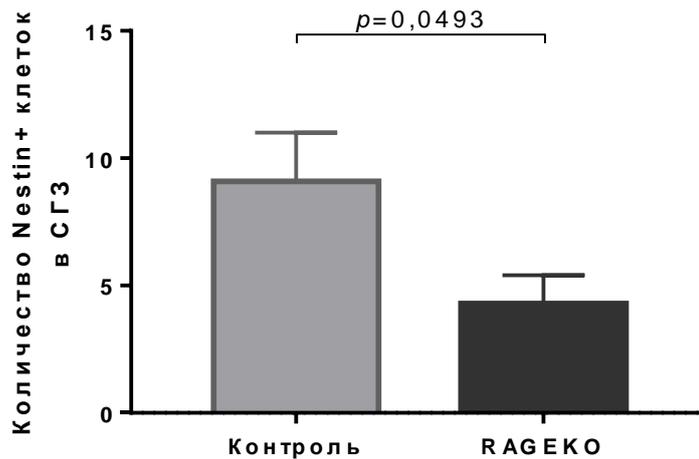
Экспрессия RAGE зависит от типа клеток и стадии развития. В целом, RAGE конституционально экспрессируется во время эмбрионального развития и подавляется во взрослом организме. За исключением кожи и легких, где RAGE высоко экспрессируется на протяжении всей жизни, в физиологических условиях RAGE экспрессируется на низких уровнях в различных клетках взрослого организма, например, в эндотелиальных клетках, кардиомиоцитах, нейтрофилах, моноцитах / макрофагах, лимфоцитах, дендритных клетках, а в центральной нервной системе (у взрослых организмов) – в клетках глии и нейронах [297]. Однако было убедительно показано, что RAGE активируется в присутствии своих лигандов [316].

Экспрессия RAGE в нейронах впервые была описана в нервной системе крупного рогатого скота в основном в моторной и корковой областях. Его идентификация в тканях в норме привела авторов к гипотезе о

физиологической, хотя и неясной, роли, которую играет RAGE. В связи с этим было проведено исследование роли выключения гена *RAGE* в процессах нейрогенеза [407].

Были исследованы маркеры раннего нейрогенеза и нейрональной дифференцировки в гиппокампе *RAGE*^{-/-} мышей.

У мышей с делецией гена *RAGE* отмечается снижение экспрессии мультипотентных стволовых клеток, экспрессирующих Nestin ($4,3 \pm 1,1$) в субгранулярной зоне зубчатой извилины в сравнении с контрольными мышами C57BL/6 ($9,1 \pm 1,9$) ($p=0,0493$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 78). Таким образом, выключение гена *RAGE* ингибирует пролиферацию стволовых клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины, что может приводить к нарушению последующих этапов нейрогенеза.



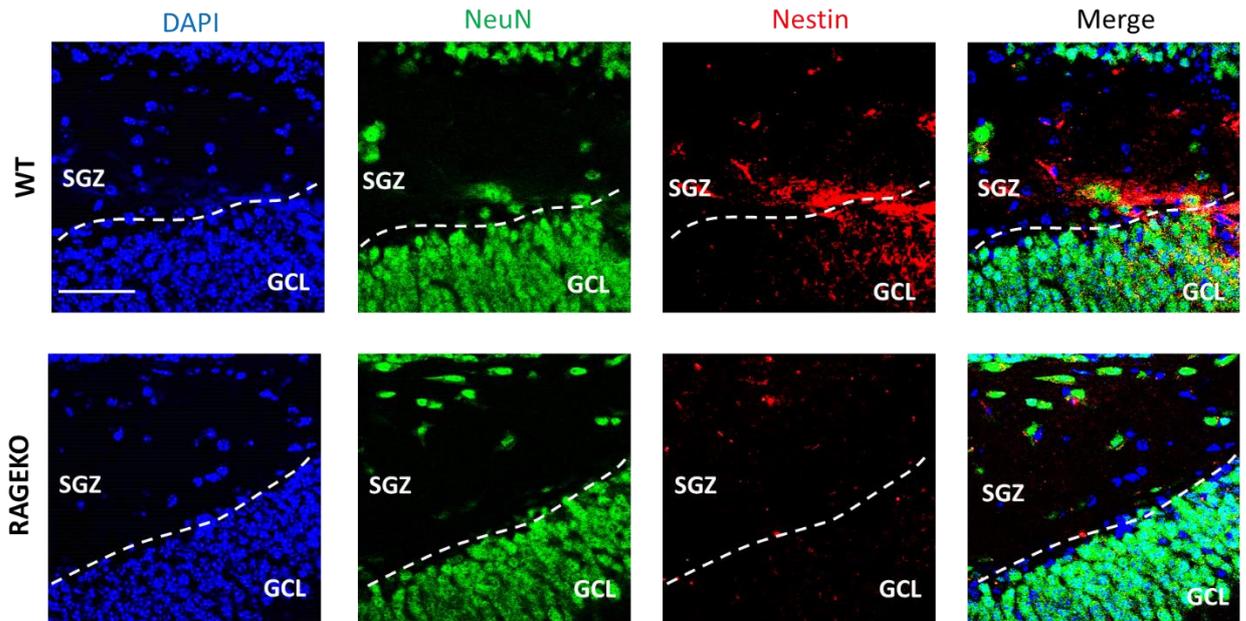


Рисунок 78 – (А) Количество Nestin⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б)–Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия Nestin (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, RAGEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала 100 мкм.

Для изучения последующих событий в нейрогенезе *RAGE*^{-/-} мышей были определены маркеры DCX и MAP2. DCX широко экспрессируется мигрирующими нейробластами, а MAP-2 представляет собой нейрон-специфический цитоскелетный белок, который используется в качестве маркера нейронального фенотипа [379].

Так было установлено, что в зубчатой извилине гиппокампа *RAGE*^{-/-} мышей экспрессируется статистически значимо меньше DCX⁺ клеток – $4,2 \pm 1,6$ в контроле – $14,6 \pm 2,5$ ($p=0,0044$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 79).

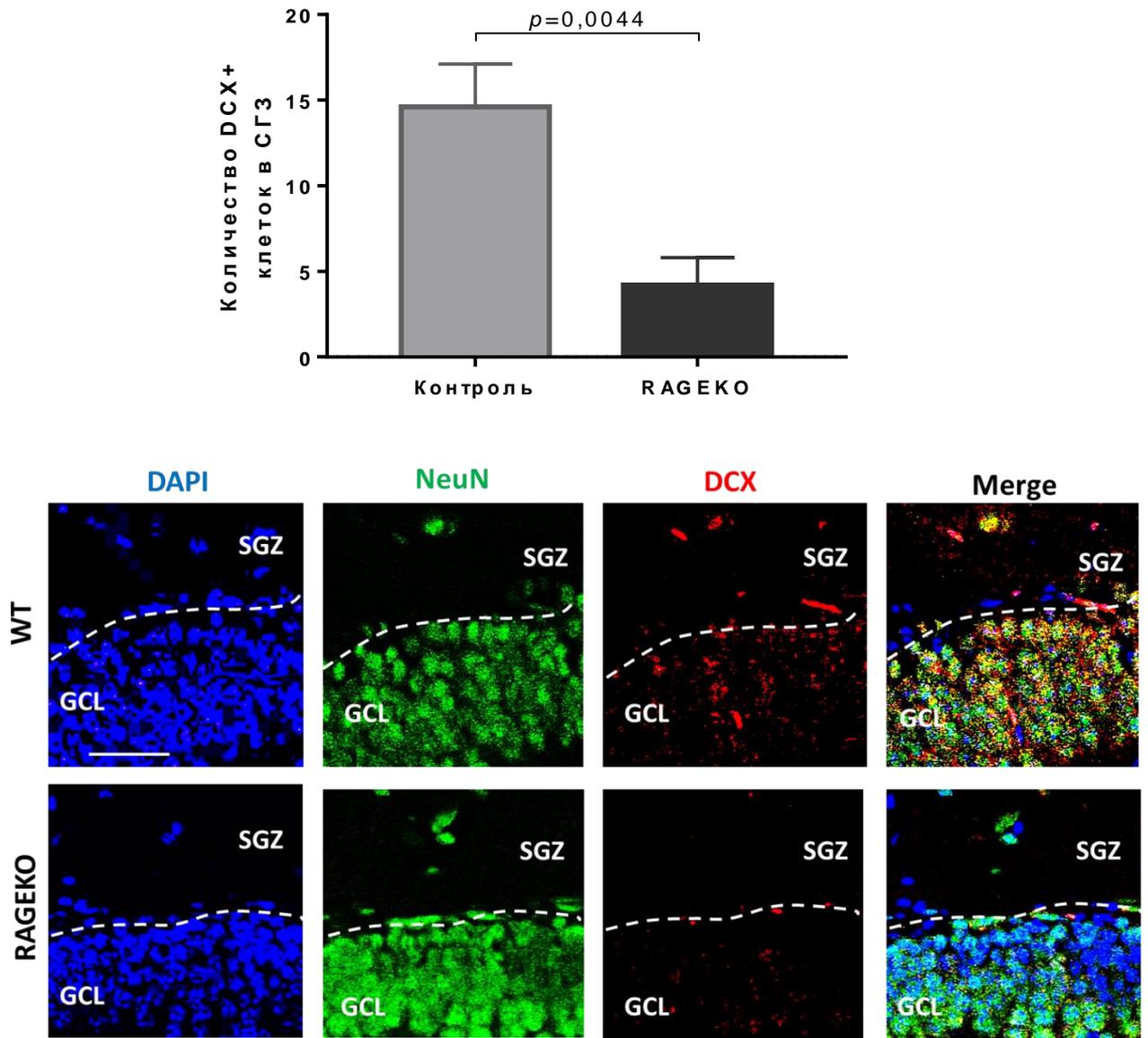


Рисунок 79 – (А) Количество DCX+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б)–Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия DCX (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, RAGEKO – мыши нокаутные по гену *RAGE*. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала 100 мкм.

При изучении экспрессии MAP2+ нейронов, снижение экспрессии которых, как известно, может привести к нейродегенерации, выявили также значительное снижение MAP2+ клеток при делеции гена *RAGE* относительно контроля. Для количественной характеристики была определена интенсивность свечения в пикселях в поле зрения. В группе *RAGE*^{-/-} мышей средняя интенсивность сигнала составила 144,2±19,2, тогда как в группе после

моделирования амилоид-индуцированной нейродегенерации – $211,3 \pm 23,4$ ($p=0,0467$) (Рисунок 80).

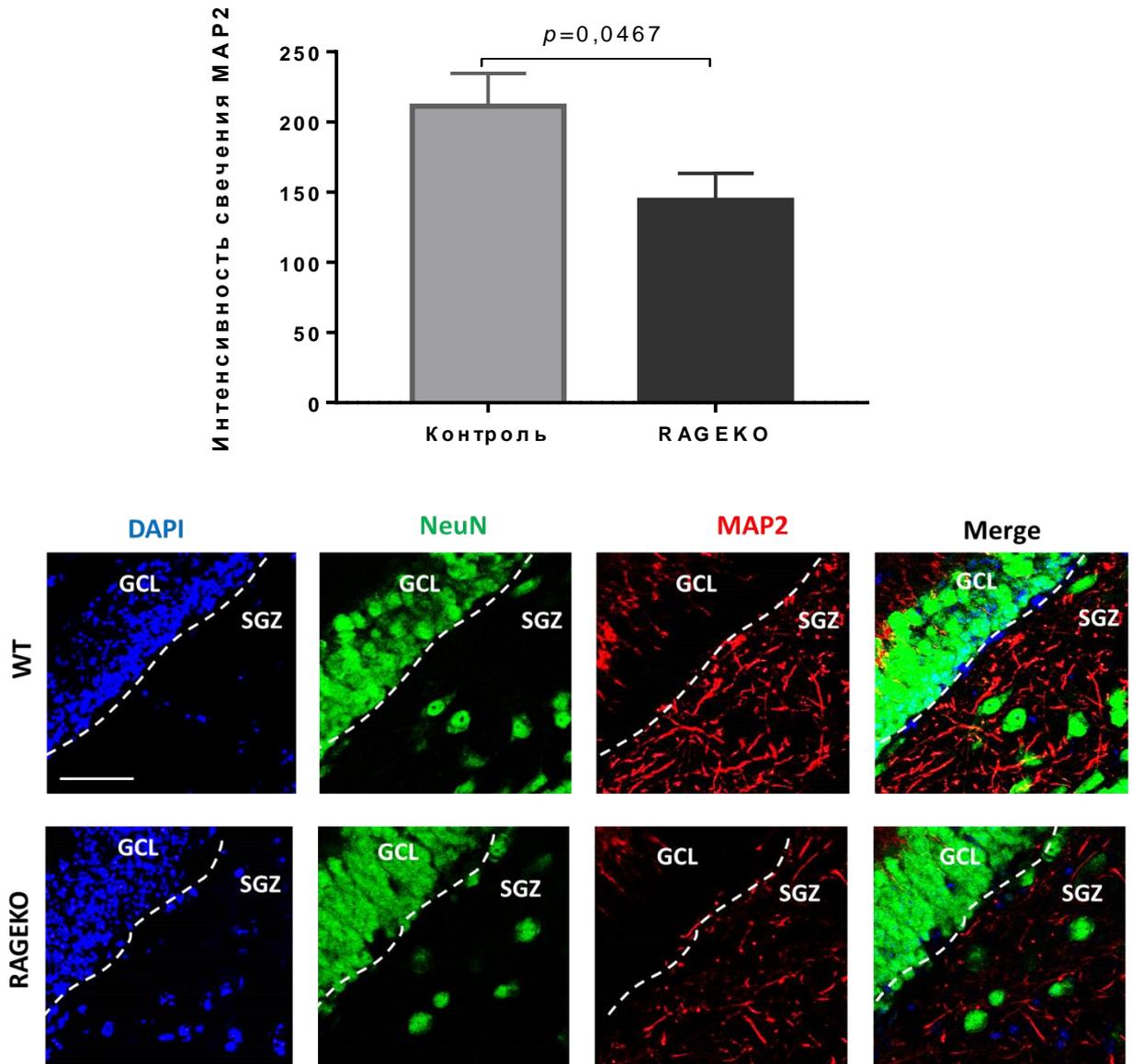


Рисунок 80 – (А) Интенсивность свечения MAP2+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (Б) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия MAP2 (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. WT – контрольные мыши дикого типа, RAGEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала 100 мкм.

Таким образом, было впервые описано, что делеция гена *RAGE* приводит к изменениям в нейрогенезе и характеризуется снижением экспрессии маркеров как ранних этапов нейрогенеза, так и этапов приобретения клетками нейрональной судьбы.

3.9. Результаты создания статической модели нейрогенной ниши

В данном блоке экспериментов было проведено изучение пролиферации нейросфер *in vitro* в физиологических условиях, в условиях при добавлении олигомеров бета-амилоида и при фотоактивации. Данный анализ был выполнен с помощью системы «xCELLigence» (Roche, Швейцария), предназначенной для анализа пролиферации клеток в режиме реального времени в течение 72 часов с интервалом 15 мин.

Динамические изменения показателей клеточного индекса нейросфер, культивируемых в различных экспериментальных условиях, представлены на рисунке 81.

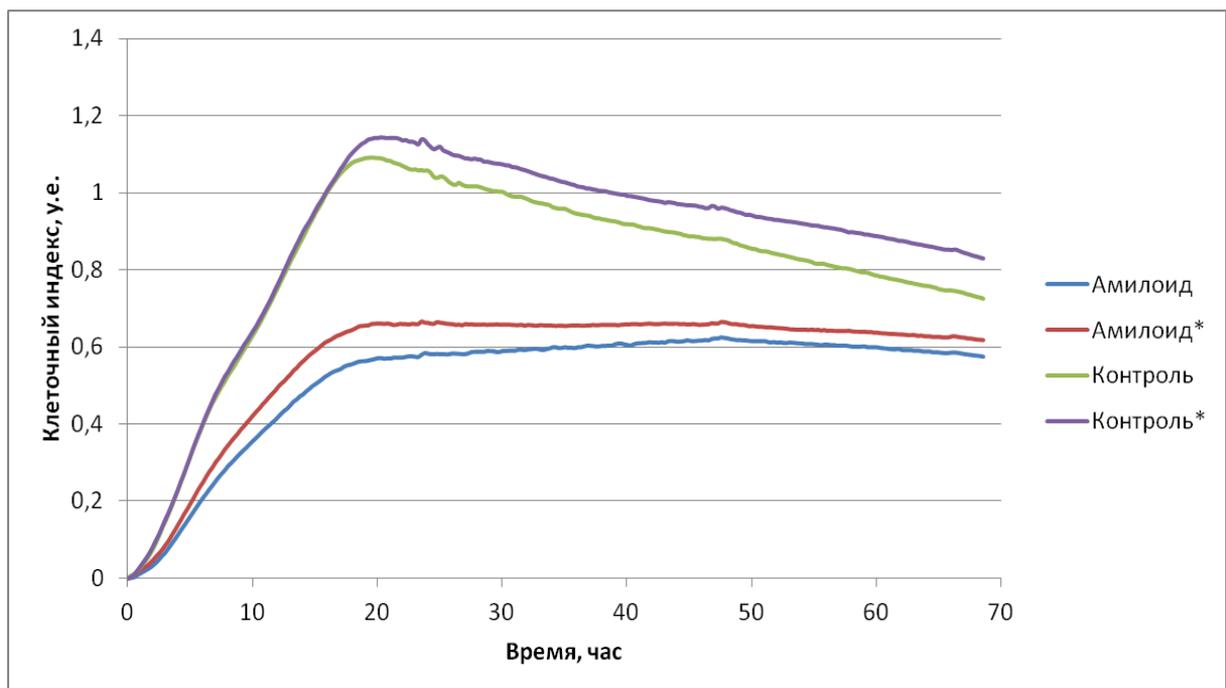


Рисунок 81 – Динамические изменения показателя клеточного индекса в исследуемых группах:

Контроль – интактные клетки (сокультура нейросфер с астроцитами);

Контроль* – сокультура нейросфер с астроцитами, которые подверглись фотоактивации;

Амилоид – нейросферы, культивируемые в присутствии β -амилоида и астроцитов;

Амилоид* – нейросферы, культивируемые в присутствии β -амилоида и астроцитов, которые подверглись фотоактивации.

В ходе эксперимента было установлено, что сокультивирование нейросфер и астроцитов, подвергшихся фотоактивации, стимулирует

дифференцировку нейросфер, проявляющуюся увеличением клеточного индекса как в группе контроля, так и в группе с аппликацией бета-амилоида. Так выявлено статистически достоверное влияние фактора культивирования с амилоидом ($F(1,24)=5698, p<0,0001$) и влияние фотоактивации ($F(1,24) =51,59, p<0,0001$). При множественном сравнении с помощью критерия Tukey's выявлены статистически достоверные различия в группах контроля без фотоактивации ($1,0919\pm 0,007$) и после фотоактивации ($1,1435\pm 0,006$) ($p<0,0001$), в группе с аппликацией амилоида без фотоактивации ($0,6256\pm 0,006$) и после фотоактивации ($0,664\pm 0,006$) ($p=0,0012$). Кроме того, статистически достоверные различия были зафиксированы между группами контроля и с добавлением бета-олигомеров амилоида (Рисунок 82).

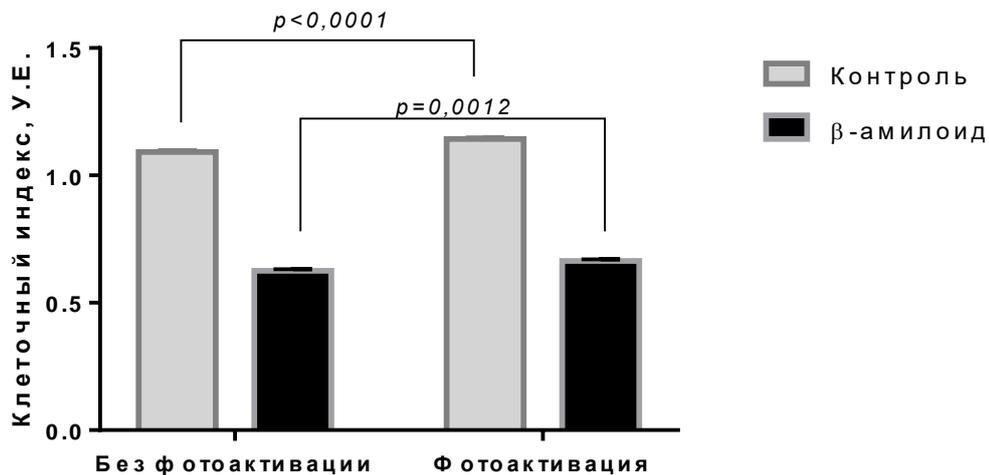


Рисунок 82 – Показатель пролиферативной активности (клеточного индекса) в контрольной и опытной группах клеток (после фотоактивации астроцитов)

Таким образом, в ходе исследования было обнаружено, что присутствие фотоактивированных астроцитов приводит к повышению индекса пролиферативной активности прогениторных клеток, в то время как воздействие амилоида приводит к снижению показателя клеточного индекса прогениторных клеток.

3.10. Результаты нейроповеденческого тестирования

3.10.1. Поведенческая оценка пространственной памяти у крыс с инъекционной моделью болезни Альцгеймера

В данном эксперименте крысы с инъекцией растворимых форм A β 1-42 и контрольные животные с пространственной тренировкой прошли обучение в водном лабиринте Морриса в течение 5 последовательных дней, в каждый из которых они искали скрытую под водой платформу, используя пространственные ориентиры в бассейне, последний день тестирования был без скрытой платформы.

Для интерпретации полученных результатов были использованы следующие параметры: время нахождения крысы в квадрате со скрытой платформой, число входов в квадрат с платформой, латентное время входа в квадрат с платформой.

Для анализа полученных данных за пять дней тестирования с целью изучения влияния растворимых олигомеров бета-амилоида на пространственную (гиппокамп-зависимую) память был использован двухфакторный ANOVA (для повторяющихся измерений) для выявления значимого влияния двух факторов: *Группы (операция A β или PBS)* и *Времени (дни тестирования)*.

При изучении времени нахождения в квадрате с платформой было отмечено статистически значимое влияние группы – $F(1,178)=43,7, p<0,0001$, влияние дней тестирования было статистически незначимым $F(4,178)=1,435, p=0,2243$. Вместе с тем значимым было влияние взаимосвязи двух факторов $F(4,178)=2,558, p=0,0404$ (Рисунок 83). Анализ с помощью критерия Tukey's (множественное сравнение групп в каждый из тестируемых дней) продемонстрировал статистически значимые различия между группами с введением растворимых форм олигомеров и фосфатного буфера в 4 и 5 дни

тестирования, т.е. при непосредственном приобретении памяти. А именно, в четвертый день тестирования время нахождения в искомом квадрате у контрольных животных составило ($16,175 \pm 0,885$ с), в то время как у группы после моделирования БА ($8,494 \pm 1,135$ с) ($p=0,0006$, Tukey's критерий). В пятый день тестирования наблюдалась схожая динамика – увеличение времени нахождения животных контрольной группы в искомом квадрате ($18,2 \pm 1,783$ с), тогда как у экспериментальной группы данный параметр был статистически значимо ниже ($10,433 \pm 0,884$) ($p=0,0006$, Tukey's критерий).

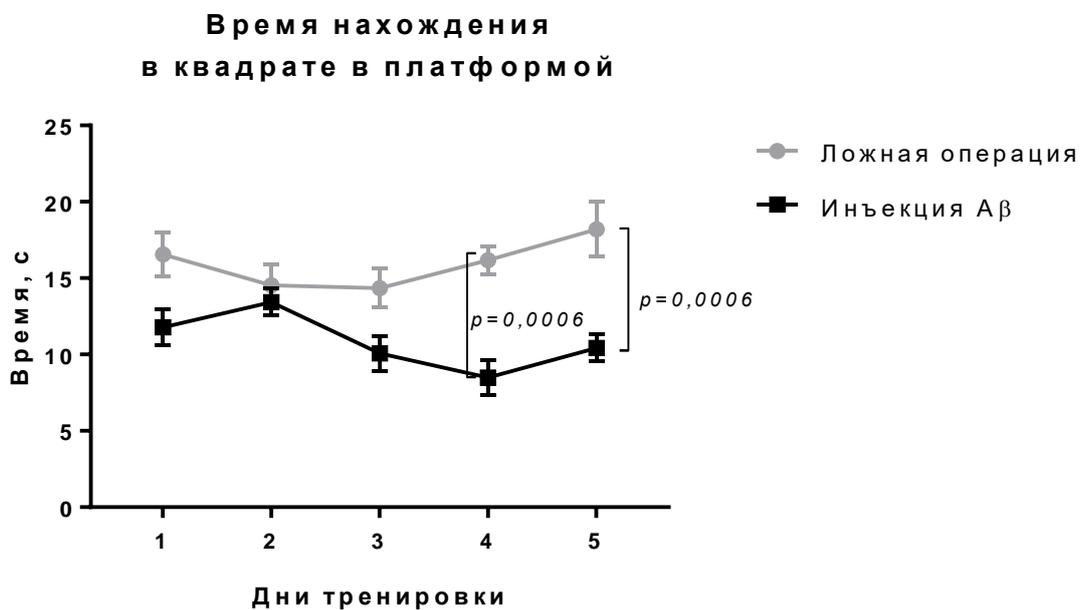


Рисунок 83 – Время (с) нахождения крыс в квадрате с платформой с течением тренировок в водном лабиринте Морриса (ВЛМ). Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

Таким образом, у крыс с моделированием болезни Альцгеймера не происходит увеличения времени нахождения в квадрате со скрытой платформой с течением времени, т.е. с увеличением тренировочных дней.

Следующий анализируемый параметр теста водный лабиринт Морриса – число входов в квадрат со скрытой платформой. При двухфакторном дисперсионном анализе выявили статистически значимое влияние группы (типа операции) - $F(1,251)=18,15$, $p<0,0001$, влияние дней тестирования было статистически незначимым $F(4,251)=2,224$, $p=0,0669$, также как и влияния

взаимодействия этих факторов $F(4,251)=1,131$, $p=0,3422$. Наблюдаемая по графику динамика изменений числа входов в каждой группе показывает большее число пересечений искомого квадрата у животных с проведением ложной операции по сравнению с экспериментальной болезнью Альцгеймера (Рисунок 84).

Число входов в квадрат с платформой

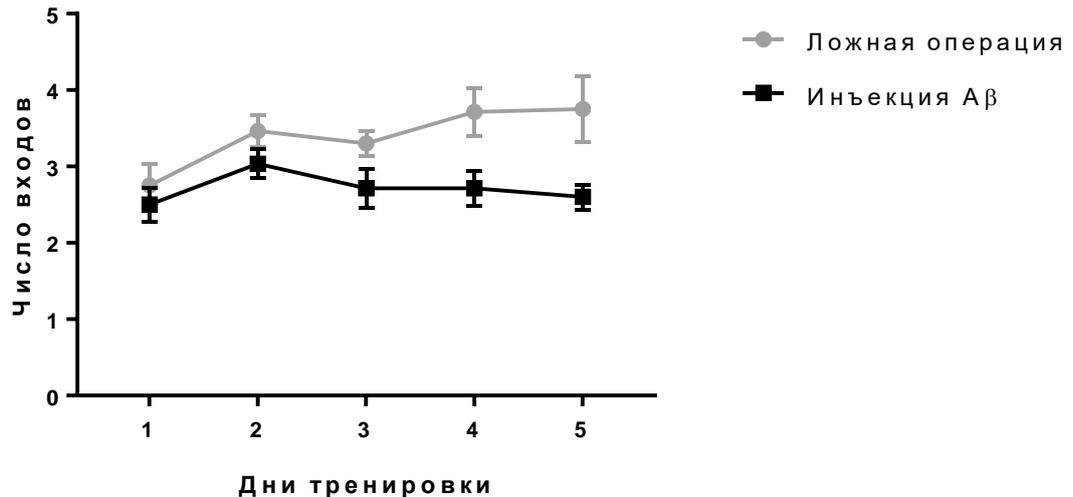


Рисунок 84 – Число входов в квадрат с платформой с течением тренировок в водном лабиринте Морриса (ВЛМ). Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

При изучении латентного времени входа в искомый квадрат со скрытой платформой выявлено статистически значимое влияние проводимой операции (группы Аβ или PBS) – $F(1,168)=19,57$, $p<0,0001$, влияние дней тестирования было также статистически значимым $F(4,168)=2,593$, $p=0,0384$, в то время как не было выявлено статистически значимого влияния взаимодействия этих факторов $F(4,168)=0,4111$, $p=0,8005$. То есть можно заключить, что на обе группы влияет пространственная тренировка, что приводит к снижению времени входа в искомый квадрат со скрытой платформой. Множественное сравнение показало статистически достоверное отличие латентного времени достижения квадрата с платформой в группе крыс с проведением моделирования болезни Альцгеймера в первый и последний дни тренировки.

Латентное время было дольше у крыс с введением олигомеров амилоида в первый день тестирования ($17,35 \pm 3,3$ с) по сравнению с последним пятым днем тренинга ($9,431 \pm 1,2$ с) ($p=0,0309$, Tukey's критерий) (Рисунок 85).

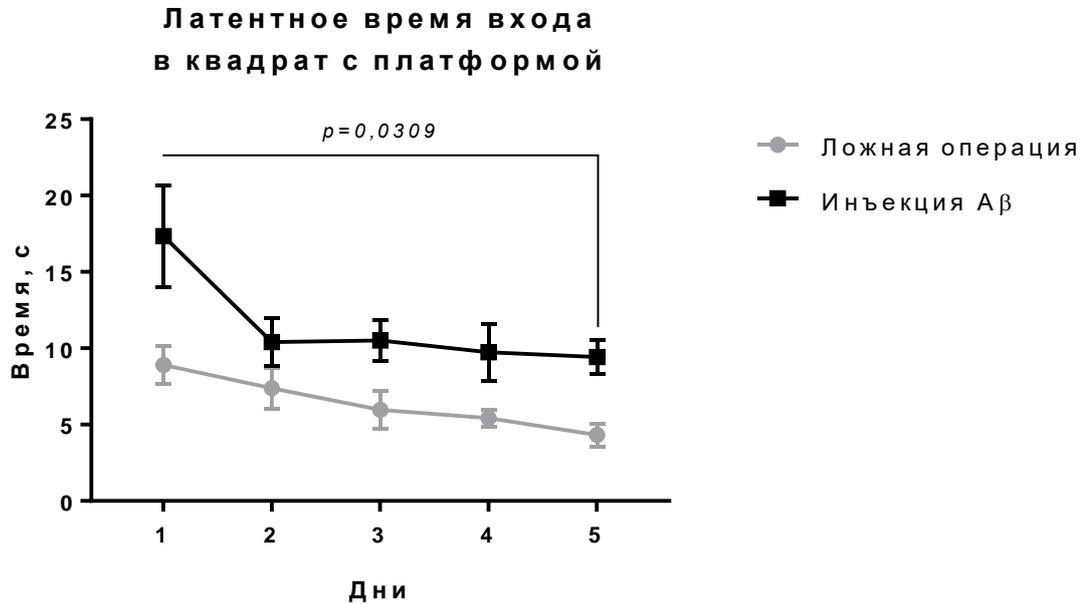


Рисунок 85 – Латентное время (с) входа в квадрат с платформой с течением тренировок в водном лабиринте Морриса (ВЛМ). Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

Результаты сравнения пространственной многодневной тренировки крыс в водном лабиринте Морриса с крысами без тренировки

Выполнение водного лабиринта Морриса в течение 5 последовательных дней может быть использовано не только для оценки пространственной памяти, но и когнитивной стимуляции, т.н. пространственной тренировки [437].

Экспериментальная и контрольная группы без пространственной тренировки также тестировались в ВЛМ в течение 1 дня, но в отсутствие скрытой платформы. Крысы без тренировки позволили нам провести контроль за предполагаемым влиянием стресса и физических нагрузок, а также исключить дефекты моторных и зрительных функций.

Для изучения влияния пространственной тренировки использовали те же самые параметры, что и для оценки пространственной памяти. В качестве статистического подхода применялся двухфакторный дисперсионный анализ для выявления значимого влияния двух факторов: *Группы (операция Аβ или PBS)* и *Пространственной тренировки*.

Анализируя время нахождения в квадрате со скрытой платформой двухфакторный ANOVA выявил статистически значимое влияние группы - $F(1,67)=16,2, p=0,0001$, влияние фактора пространственной тренировки было статистически незначимым $F(1,167)=0,8082, p=0,3719$, также как и влияния взаимодействия этих факторов $F(1, 67)=3,354, p=0,0715$. Тем не менее при множественном анализе с помощью критерия Tukey's определено, что время в искомом квадрате больше у крыс после проведения ложной операции и пространственной тренировки в ВЛМ в течение 5 дней и составило $18,2 \pm 7,773$ (с), тогда как у таких же крыс, но без когнитивной стимуляции данный показатель был $14,579 \pm 3,097$ (с) ($p=0,0004$) (Рисунок 86).

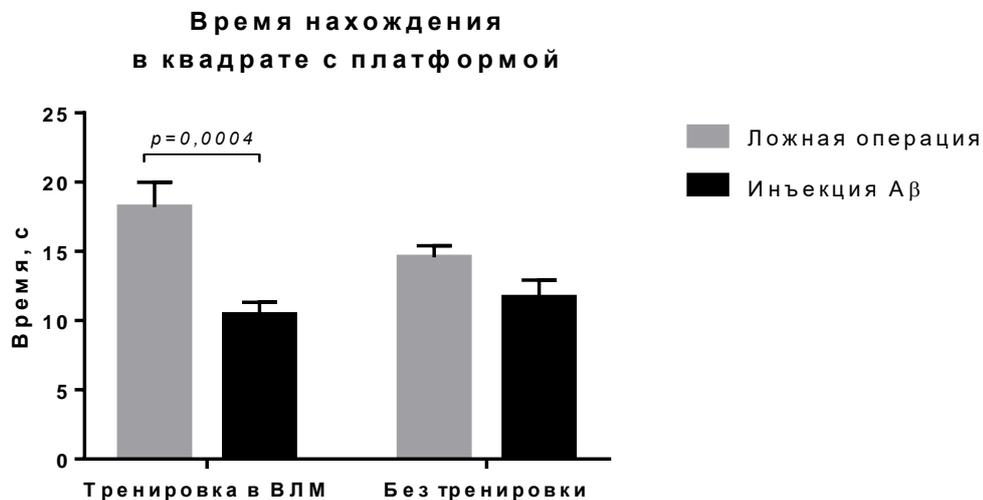


Рисунок 86 – Время (с) нахождения крыс в квадрате с платформой крыс с тренировкой в водном лабиринте Морриса (ВЛМ) и без тренировки. Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

Число входов в искомых квадрат у двух групп крыс с разными операциями и фактором наличия или отсутствия пространственной

тренировки статистически значимо не отличался (фактор группы $F(1,89)=3,362$, $p=0,0700$, влияние фактора пространственной тренировки $F(1,89)=0,1688$, $p=0,6822$, влияние взаимодействия этих факторов $F(1,89)=1,94$, $p=0,1671$) (Рисунок 87).

Число входов в квадрат с платформой

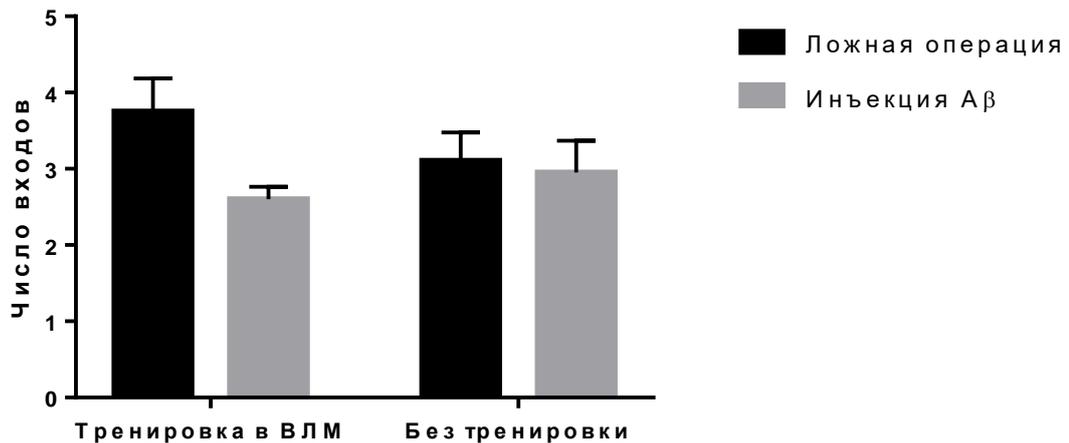


Рисунок 87 – Число входов в квадрат с платформой крыс с тренировкой в водном лабиринте Морриса (ВЛМ) и без тренировки. Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

При анализе латентного времени входа в квадрат очевидно влияние фактора группы (проведения операции) – $F(1,72)=9,365$, $p=0,0031$, а также фактора пространственной тренировки – $F(1,72)=15,22$, $p=0,0002$. Влияние взаимодействия данных факторов не обнаружено – $F(1,72)=0,135$, $p=0,7144$. При множественном сравнении выявили отличия в группах с введением Аβ с тренировкой и без нее: после пятидневной тренировки в ВЛМ в группе с введением Аβ ($9,431 \pm 1,2$ с) и без тренировки ($17,35 \pm 4,0$ с) ($p=0,0189$, Tukey's критерий) (Рисунок 88).

Латентное время входа в квадрат с платформой

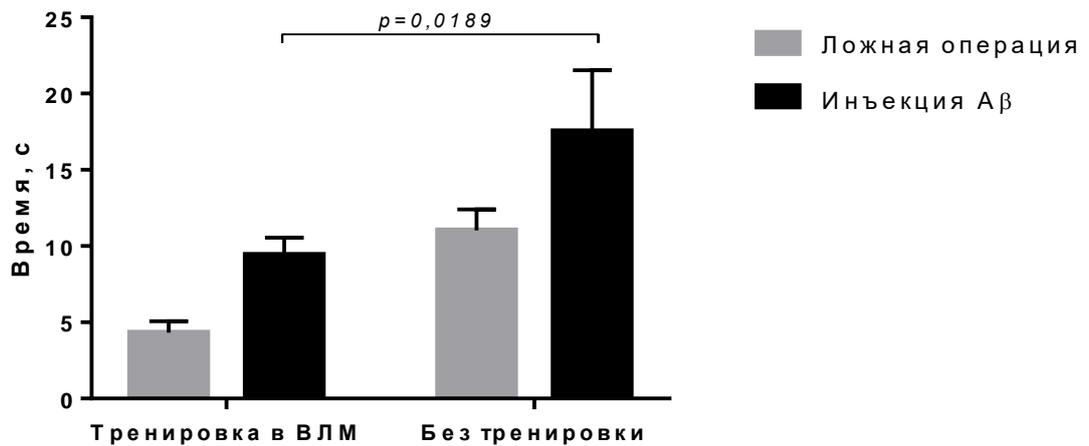


Рисунок 88 – Латентное время (с) входа в квадрат с платформой крыс с тренировкой в водном лабиринте Морриса (ВЛМ) и без тренировки. Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

Таким образом, можно заключить, что на выполнение ВЛМ влияет не только проведение операции с моделированием БА, но и также значимое влияние оказывает пространственная стимуляция.

3.10.2. Поведенческая оценка тревожности у крыс с инъекционной моделью болезни Альцгеймера

При исследовании тревожности у крыс после моделирования болезни Альцгеймера проводили тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» [404]. Для интерпретации полученных результатов были использованы следующие параметры: время нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах; общая пройденная дистанция; дистанция, пройденная, в открытых и закрытых рукавах, а также процент входов в открытые и закрытые рукава от общего числа входов.

Выявление увеличения активности грызунов в открытых рукавах (времени и / или входов) отражает анти-тревожное поведение и напротив, предпочтение закрытых рукавов может быть трактовано как усиление тревожности у животных. Поведение в этом тесте (то есть активности в

рукавах) отражает конфликт между предпочтением грызуна находиться в безопасном месте (закрытых рукавах) и их врожденной мотивацией исследовать новые среды (открытые рукава) [404].

При изучении тревожного поведения у крыс после моделирования болезни Альцгеймера выявили статистически достоверное увеличение времени пребывания в закрытых рукавах ($75,113 \pm 15,824$ с) по сравнению с крысами контрольной группы ($22,388 \pm 6,033$) ($p=0,007$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 89А).

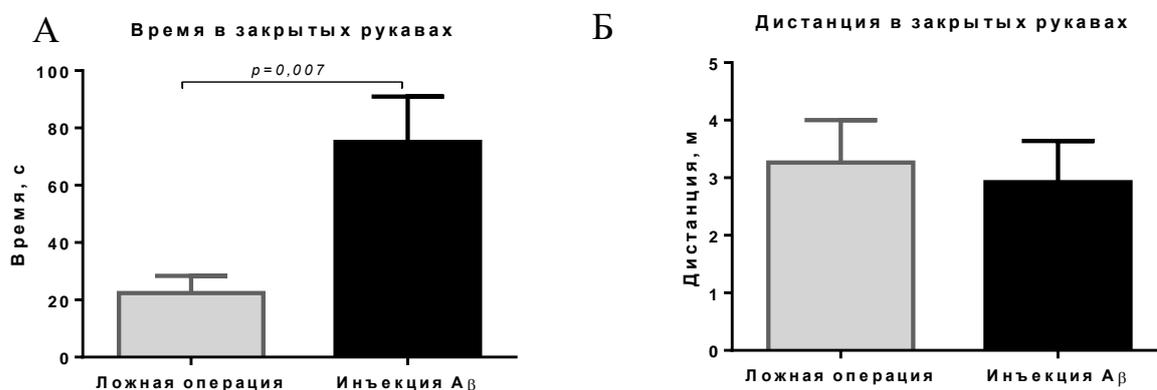


Рисунок 89 – (А) – Время (с) в закрытых рукавах в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ); (Б) – дистанция, пройденная в закрытых рукавах в ПКЛ. Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Aβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

При этом не было отмечено отличий в пройденной дистанции в закрытых рукавах между группами с моделированием БА и ложно-оперированными крысами ($3,266 \pm 0,73$ м) и ($2,923 \pm 0,72$ м) соответственно ($p=0,6835$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 89Б).

Несмотря на это, зафиксировали статистически значимое увеличение процента числа входов в закрытые рукава от общего числа перемещений у крыс после инъекции растворимых форм олигомеров амилоида ($41,74 \pm 3,76$ %) по сравнению с крысами после проведения ложной операции ($32,7 \pm 3,42$ %) ($p=0,0401$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 90А).

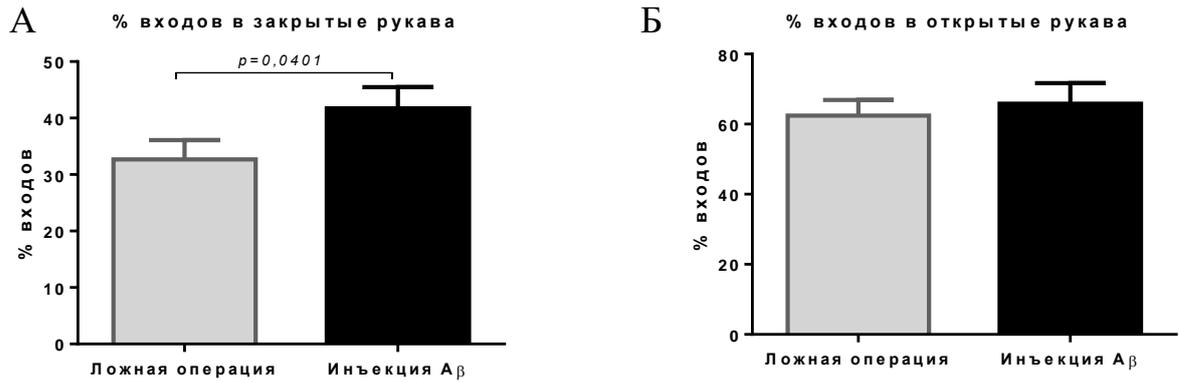


Рисунок 90 – (А) – Процент входов в закрытые рукава от общего числа входов в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ); (Б) – Процент входов в открытые рукава от общего числа входов в тесте ПКЛ. Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

Время пребывания в открытых рукавах не отличалось между группами (Рисунок 91А), также как и не наблюдали отличий в проценте входов в открытые рукава от общего числа входов (Рисунок 90Б). Тем не менее дистанция, пройденная крысами в открытых рукавах, в группе с БА статистически значимо была ниже ($3,16 \pm 0,26$) по сравнению с группой контроля ($5,078 \pm 0,54$) ($p=0,0059$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 91Б).

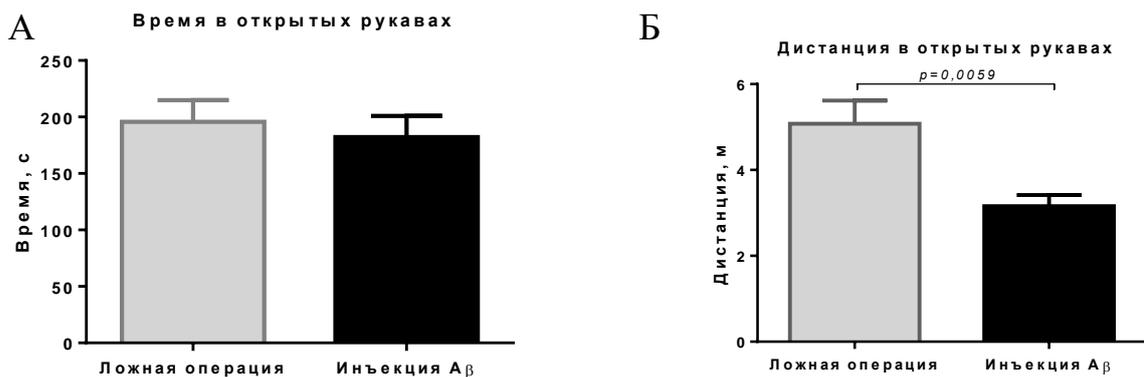


Рисунок 91 – (А) – Время (с) в открытых рукавах в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ); (Б) – Дистанция (м) в открытых рукавах в тесте ПКЛ. Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Аβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

Отличий в общей пройденной дистанции не зафиксировали (Рисунок 92).

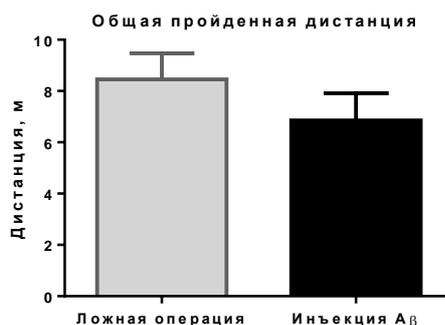


Рисунок 92 – Общая пройденная дистанция (м) в тесте ПКЛ. Ложная операция – интрагиппокампальная инъекция PBS, инъекция Aβ – введение олигомеров бета-амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера.

Таким образом, описанные результаты позволяют суммировать, что крысы с моделированием болезни Альцгеймера проявляют признаки тревожного поведения, что проявляется увеличенным временем пребывания закрытых рукавах, увеличением процента числа входов в закрытые рукава, а также снижением дистанции, пройденной в открытых рукавах.

3.10.3. Поведенческая оценка эмоциональной ранней и отсроченной памяти у мышей с инъекцией растворимых форм Aβ олигомеров

Консолидация памяти включает в себя процесс, благодаря которому вновь полученная информация сохраняется в течение длительного времени. Данные, полученные за последние несколько десятилетий, указывают на то, что эмоциональное возбуждение в течение периода консолидации влияет и усиливает силу памяти. Механизмы, лежащие в основе эмоциональных воздействий на память, включают высвобождение гормонов стресса и активацию базолатеральной миндалины, которые работают вместе, чтобы модулировать консолидацию памяти. Кроме того, работа предполагает, что эта модуляция памяти на основе миндалины происходит с многочисленными типами обучения и вовлекает взаимодействия со многими различными областями мозга, чтобы изменить консолидацию. Кроме того, исследования

показывают, что эмоциональное возбуждение и активность миндалины, в частности, влияют на синаптическую пластичность и связанные с ней белки в различных отделах мозга [234].

Условно-рефлекторное кондиционирование страха является основной поведенческой парадигмой для изучения молекулярных механизмов обучения и памяти, потому что четкий ответ на определенный стимул окружающей среды производится посредством ассоциативных процессов обучения. С помощью данного подхода представляется возможным изучение памяти, ассоциированной со страхом [194].

Формирование эмоциональной памяти, ассоциированной со страхом, является ценным нейробиологическим инструментом, поскольку этот процесс включает в себя определенный стимул под контролем экспериментатора, который вызывает измеримый набор поведенческих и физиологических реакций после обучения. При формировании такого «кондиционирования» страха эмоционально нейтральный условный стимул, такой как тон, сочетается с эмоционально мощным, врожденным отвращением к безусловному стимулу (электрическому шоку) во время фазы кондиционирования или приобретения. Эта процедура называется созданием условий для возникновения страха (замирания). Затем оценка обусловленности включает в себя измерение условных реакций, вызванных слуховым условным раздражителем, независимым от безусловного раздражителя, во время фазы тестирования памяти. Эта несколько искусственная процедура имитирует реальный жизненный опыт, в котором безусловный раздражитель причиняет боль или другой вред, а условный раздражитель возникает в связи с вредным.

Кроме того, данная методика, в зависимости от протокола, позволяет оценить недавнюю память (1 день) и отсроченную (7 дней) долговременную память [318].

Для того, чтобы оценить действие растворимых форм бета-амилоида на поведение мышей мы изучили недавнюю и отсроченную память с помощью

теста fear-conditioning («Условно-рефлекторное запоминание», FC). С данной целью был определен процент замирания в каждый тестируемый день, как это описано в методике.

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). В первый день тестирования мы отметили статистически значимое влияние операции ($F(2,193) = 3,079, p=0,0483$), и предъявляемых с течением времени стимулов ($F(3,193) = 32,68, p<0,0001$). При этом не отметили значимого влияния взаимосвязи двух факторов ($F(6,193) = 1,494, p=0,1822$) (Рисунок 93).

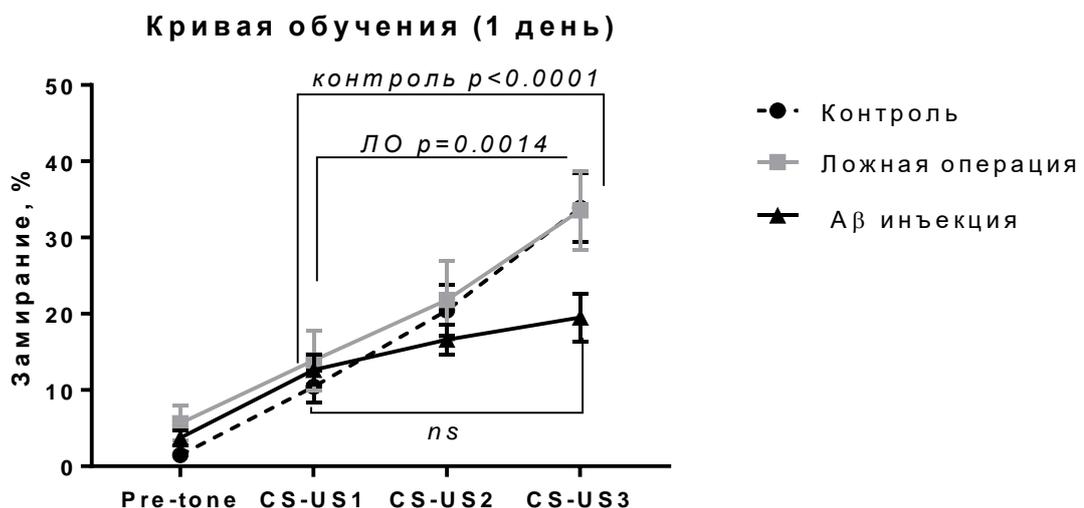


Рисунок 93 – Кривая обучения в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». Pre-tone – до подачи белого шума, CS-US1 – первая пара стимулов, CS-US2 – вторая пара стимулов, CS-US3 – третья пара стимулов. ЛО – ложная операция, ns – незначимо.

При множественном сравнении групп животных между собой с использованием *post-hoc* Tukey's критерия не выявили различия в проценте замирания у мышей контрольной группы, ложно-оперированных и с инъекцией бета-олигомеров до предоставления стимула «Pre-tone». Такая же тенденция сохраняется и при предоставлении стимулов CS-US1 и CS-US2. Однако мыши с моделированием болезни Альцгеймера, после предъявления

последней пары CS-US3 замирали меньше, что проявлялось сниженным процентом замирания ($19,52 \pm 3,18\%$) по сравнению с группой контроля ($33,88 \pm 4,5\%$) ($p=0,14$) и при сравнении с группой ложно-оперированных животных ($33,57 \pm 5,2\%$) ($p=0,15$), хотя данные наблюдения были статистически недостоверными. 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. Так показано, что процент замирания у мышей после инъекции Аβ не отличается при сравнении CS-US1 ($12,65 \pm 1,9\%$) и CS-US3 ($19,52 \pm 3,18\%$) ($p=0,9460$, Tukey's критерий), что, вероятно, можно интерпретировать как нарушение приобретения ассоциированного с белым шумом страха. У животных контрольной группы наблюдалась следующая динамика данного процесса: процент замирания у CD1 мышей статистически значимо отличается при сравнении CS-US1 ($10,43 \pm 2,12\%$) и CS-US3 ($33,88 \pm 4,5\%$) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий). Аналогичные результаты были получены при анализе процента замирания у мышей после проведения ложно операции: после предъявления первой пары стимулов CS-US1 ($13,88 \pm 3,9\%$) и после последней пары стимулов ($33,57 \pm 5,2\%$) ($p=0,0014$, Tukey's критерий). Таким образом, не выявлено нарушений на этапе приобретения памяти у контрольной группы и группы ложно-оперированных мышей, однако, мыши с инъекцией бета-амилоида 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 операции ($F(2,169) = 31,85$, $p < 0,0001$), и времени ($F(4,169) = 4,265$, $p=0,0017$). Значимого влияния взаимосвязи двух факторов не выявили ($F(8,169) = 0,5436$, $p=0,8223$) (двухфакторный ANOVA) (Рисунок 94).

Контекстный тест (2 день)

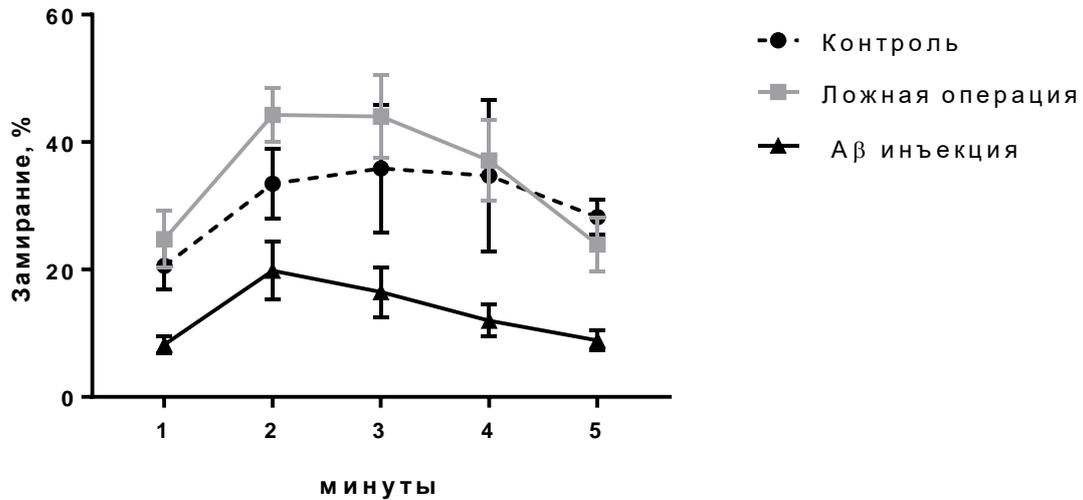


Рисунок 94 – Процент замирания во второй контекстный день (кратковременная память).

На третий день тестирования в условиях новой среды у контрольной группы мышей, мышей после проведения ложно операции и моделирования болезни Альцгеймера фиксировался процент времени замирания до предоставления слухового стимула «*Pre-tone*» и после предоставления такого стимула «*Tone*». Было отмечено статистически значимое влияние взаимосвязи двух факторов (операции и тона) ($F(2,68) = 4,562, p=0,0138$), а также каждого фактора в отдельности: операции ($F(2,68) = 6,663, p=0,0029$), и тона ($F(1,68) = 77,83, p<0,0001$) (двухфакторный ANOVA) (Рисунок 95).

Сигнальный тест (3 день)

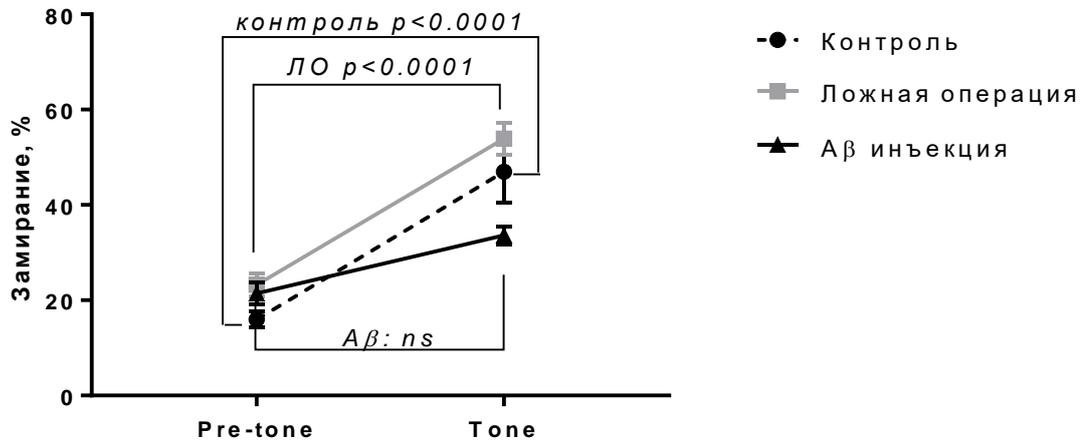


Рисунок 95 – Процент замирания в третий сигнальный день. Pre-tone – до подачи белого шума, Tone – подача белого шума. ЛО – ложная операция, ns – незначимо.

При множественном попарном сравнении выявлено, что у контрольной группы время замирания увеличивается при предоставлении стимула в виде шума ($46,96 \pm 6,51\%$) по сравнению изначальным временем замирания до предъявления шума ($15,97 \pm 1,64\%$) ($p < 0,0001$ Tukey's критерий), что свидетельствует о приобретении ассоциативной связи с белым шумом. Схожие результаты были получены в группе ложно-оперированных мышей: до предъявления тона ($23,22 \pm 2,38\%$) и после тона ($53,92 \pm 3,3\%$) ($p < 0,0001$ Tukey's критерий). У группы с инъекцией растворимых форм бета-амилоида такой разницы во времени замирания зафиксировано не было: время до предоставления слухового стимула в новом контексте составило ($21,42 \pm 2,35\%$), после – ($33,61 \pm 1,91$) ($p = 0,2181$, Tukey's критерий).

Для оценки отсроченной памяти у животных экспериментальных групп мы оценивали процент времени замирания при помещении их в контекст без подачи стимулов на 7 день после кондиционирования и при помещении в новые условия (сигнальный день) с подачей белого шума на 8 день после кондиционирования.

При изучении времени замирания в контекстный день выявили значимое влияние фактора операции ($F(2,69) = 6,75, p = 0,0021$) (Рисунок 96).

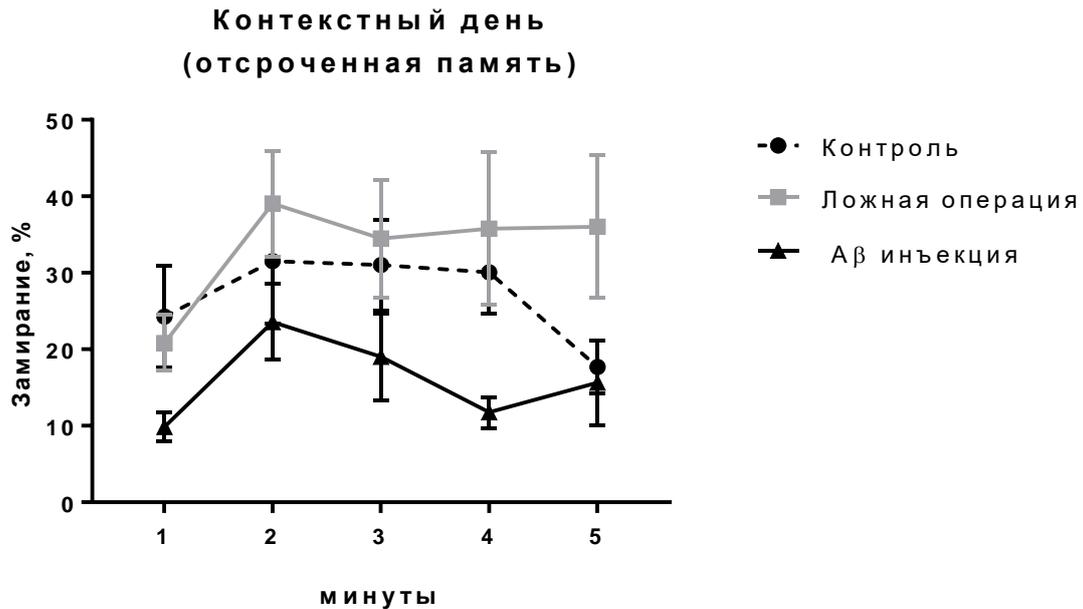


Рисунок 96 – Процент замирания в контекстный день (отсроченная память – 7 день).

В сигнальный день продемонстрировали значимое влияние подаваемого тона ($F(1,23) = 32,89$, $p < 0,0001$). При множественном попарном сравнении групп выявили, что у контрольной группы время замирания увеличивается при предоставлении стимула в виде шума ($51,06 \pm 2,68\%$) по сравнению изначальным временем замирания до предъявления шума ($22,6 \pm 4,06\%$) ($p = 0,0024$ Tukey's критерий), что свидетельствует о сохранении приобретенной ассоциативной связи с белым шумом. У ложно-оперированных животных отмечена схожая тенденция: до предъявления тона ($18,62 \pm 1,55\%$) и после тона ($41,09 \pm 7,53\%$) ($p = 0,0145$ Tukey's критерий). У группы с моделированием болезни Альцгеймера такой разницы во времени замирания отмечено не было: время до предоставления слухового стимула в новом контексте составило ($25,7 \pm 1,98\%$), после – ($35,08 \pm 4,23$) ($p = 0,8730$, Tukey's критерий) (Рисунок 97).

**Сигнальный тест
(отсроченная память)**

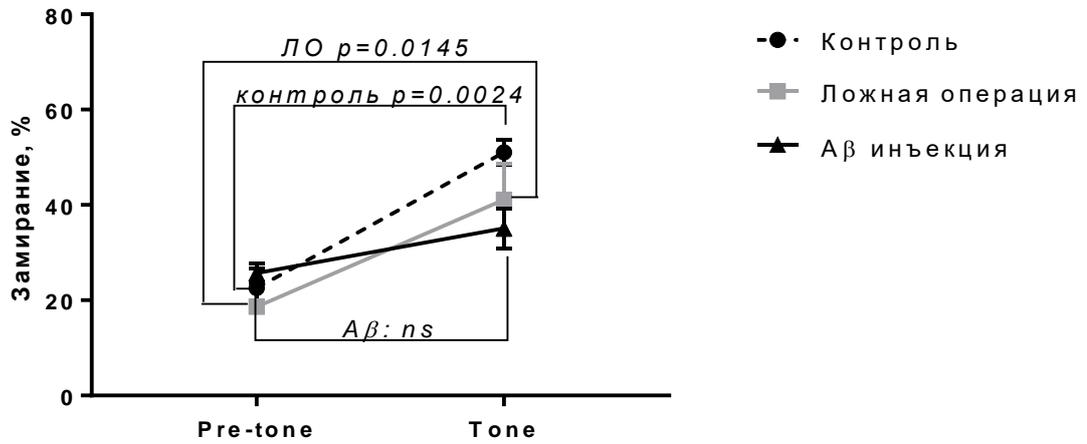


Рисунок 97 – Процент замирания в сигнальный день (отсроченная память – 8 день). Pre-tone – до подачи белого шума, Tone – подача белого шума. ЛО – ложная операция, ns – незначимо.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о наличии нарушений ассоциативного обучения и запоминания у мышей после инъекции растворимых форм бета-олигомеров.

3.10.4. Поведенческая оценка тревожности и эмоциональной ранней и отсроченной памяти у мышей с семейной формой болезни Альцгеймера

3.10.4.1. Поведенческая оценка общей и исследовательской активности и тревожности у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (5xFAD)

Мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия B6SLJ - Tg(APP^{SweFlon},PSEN1^{M146L}*L286V)⁶⁷⁹⁹Vas) тестировали в тесте «Открытое поле» для оценки общей локомоторной активности, исследовательской активности и тревожности [353]. В качестве контроля использовали мышей с генетическим фоном C57Bl6.

При помещении центр в открытого поля неживого (несоциального объекта) проводили оценку исследовательской активности. В следующей сессии экспериментов в центр поля вместо несоциального объекта помещали социальный (другую особь) для изучения социального интереса и предпочтения [255].

С помощью данного теста можно сделать заключение об основных трех аспектах поведения: 1) общей локомоторной активности путем регистрации общей дистанции (в метрах) в течение всего времени тестирования; 2) исследовательской активности (предпочтение исследовать центральную часть и/или помещенный в центр поля живой/неживой объект; 3) тревожное поведение за счет оценки тенденции оставаться близко к стенкам поля (тигмотаксис) и снижением времени нахождения в центре [255, 353].

В каждой сессии оценивали: дистанцию, пройденную в открытом поле; время в центральной части открытого поля, число входов в центр, а также дистанцию в центральной части. В сессиях с объектами оценивали также число подходов и время, проведенное с несоциальным/социальным объектом.

В первой сессии при помещении мыши в открытое поле выявили, что пройденная дистанция у мышей с генетической болезнью Альцгеймера была ниже ($31,47 \pm 5,97$ м) по сравнению с мышами контрольной группы ($51,9 \pm 3,34$ м) ($p=0,0133$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 98). Число входов в центральную часть открытого поля у 5xFAD мышей статистически значимо меньше ($74,88 \pm 11,83$) в сравнении с контрольными мышами дикого типа ($99,7 \pm 4,82$) ($p=0,0321$, критерий Манна-Уитни), тем не менее не выявили статистически значимых отличий во времени нахождения в центральной части у мышей с генетической моделью БА ($194,1 \pm 29,05$ с) и у мышей контроля ($173,7 \pm 30,07$) ($p=0,1011$, критерий Манна-Уитни). Дистанция, пройденная в центральной части открытого поля мышами с генетической болезнью Альцгеймера, была статистически значимо меньше ($10,95 \pm 2,25$ м) дистанции, пройденной в центре контрольными мышами ($17,67 \pm 0,99$ м) ($p=0,0266$, критерий Манна-Уитни). Поэтому в совокупности, полученные данные позволяют заключить о снижении общей активности (за счет снижения общей дистанции), снижении исследовательской активности (из-за снижения числа входов в центральную часть, а также снижения дистанции в этой части). Это свидетельствует о предпочтении мышами с БА находиться большую часть времени на периферии, проявляя тревожность, поскольку у животных с преимущественно тревожным поведением и беспокойством отмечается специфичная траектория с преобладанием движения по периферии поля [353].

Во второй сессии в центр открытого поля поместили неживой объект для изучения исследовательской активности мышей. Общая дистанция, пройденная в данном тесте, у мышей с БА была статистически значимо ниже ($22,54 \pm 2,97$ м) в сравнении с мышами дикого типа ($37,38 \pm 3,66$ м) ($p=0,036$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 99). Число входов в центральную часть также было снижено у 5xFAD мышей ($71,63 \pm 11,09$) относительно WT мышей ($101,2 \pm 7,11$) ($p=0,0436$, критерий Манна-Уитни). При этом, как и в первой сессии, время в центральной части не отличалось между группами ($p=0,1416$, критерий Манна-Уитни). Однако, дистанция, пройденная мышами с

генетической болезнью Альцгеймера, была короче ($9,5 \pm 1,44$ м), чем у мышей контроля ($16,83 \pm 1,4$ м) ($p=0,0033$, критерий Манна-Уитни). Интересным при этом представляется отметить, что ни число подходов, ни время, проведенное с объектом, стоящим в центре, у двух групп не отличалось ($p=0,9216$) и ($p=0,0673$) соответственно. Это говорит о том, что, несмотря на сохраняющуюся тревожность и беспокойство в открытом пространстве, тем не менее мыши с БА проявляют интерес к несоциальному объекту.

В третьей части эксперимента с предъявлением живого (социального стимула) оценивали те же параметры. Пройденная дистанция в тесте, как и в предыдущих сессиях, была снижена у мышей с генетической формой БА ($18,93 \pm 2,9$ м), в контроле ($28,3 \pm 3,89$ м) ($p=0,0451$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 100). Следует особо подчеркнуть, что и в группе контроля, и в группе 5xFAD отмечается снижение общей пройденной дистанции на протяжении от первой сессии к третьей, что является нормальной реакцией мышей – привыканием к пространству. Число входов в центральную часть поля меньше у мышей с БА ($61,43 \pm 6,02$) по сравнению с контрольными мышами ($77,6 \pm 3,31$) ($p=0,0328$, критерий Манна-Уитни). При этом время, проведенное в центральной части, не отличалось между группами ($p=0,1061$, критерий Манна-Уитни), также, как и дистанция, пройденная в центральной части ($p=0,7679$, критерий Манна-Уитни). Также не было выявлено статистически значимых отличий во времени, проведенном с социальным объектом между группами ($p=0,4318$), так и числа подходов к нему ($p=0,7891$).

В совокупности полученные данные свидетельствует в пользу того, что на ранних стадиях БА, несмотря на проявления тревожности и беспокойства, мыши, тем не менее сохраняют социальный интерес и проявляют поисковую и исследовательскую активность.

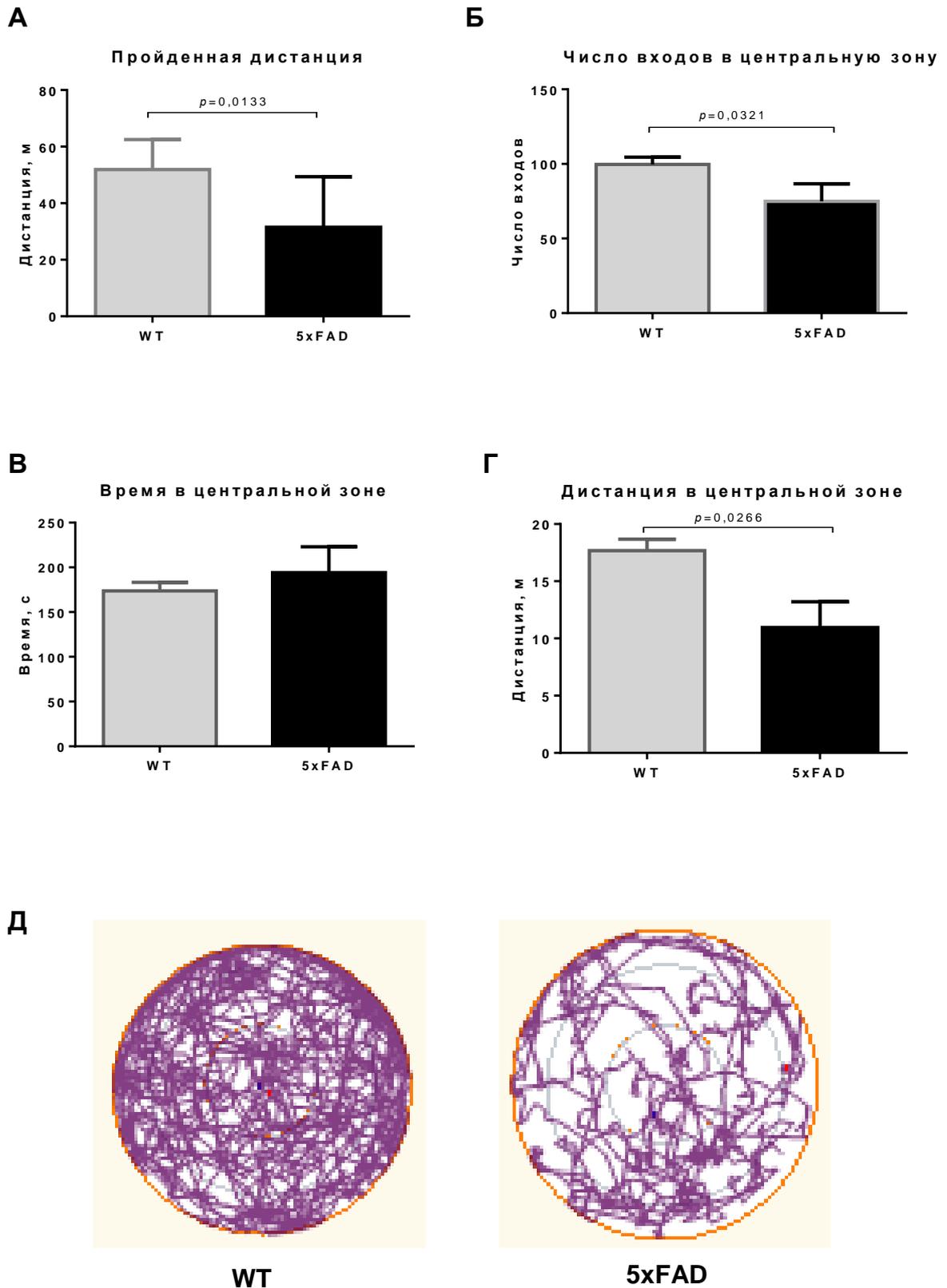


Рисунок 98 – Первая сессия теста «Открытое поле». (А) – Пройденная дистанция, м; (Б) – Число входов в центральную зону; (В) – Время в центральной зоне; (Г) – Дистанция в центральной зоне; (Д) – Треки движения в тесте «Открытое поле». WT – контрольные мыши дикого типа; 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера.

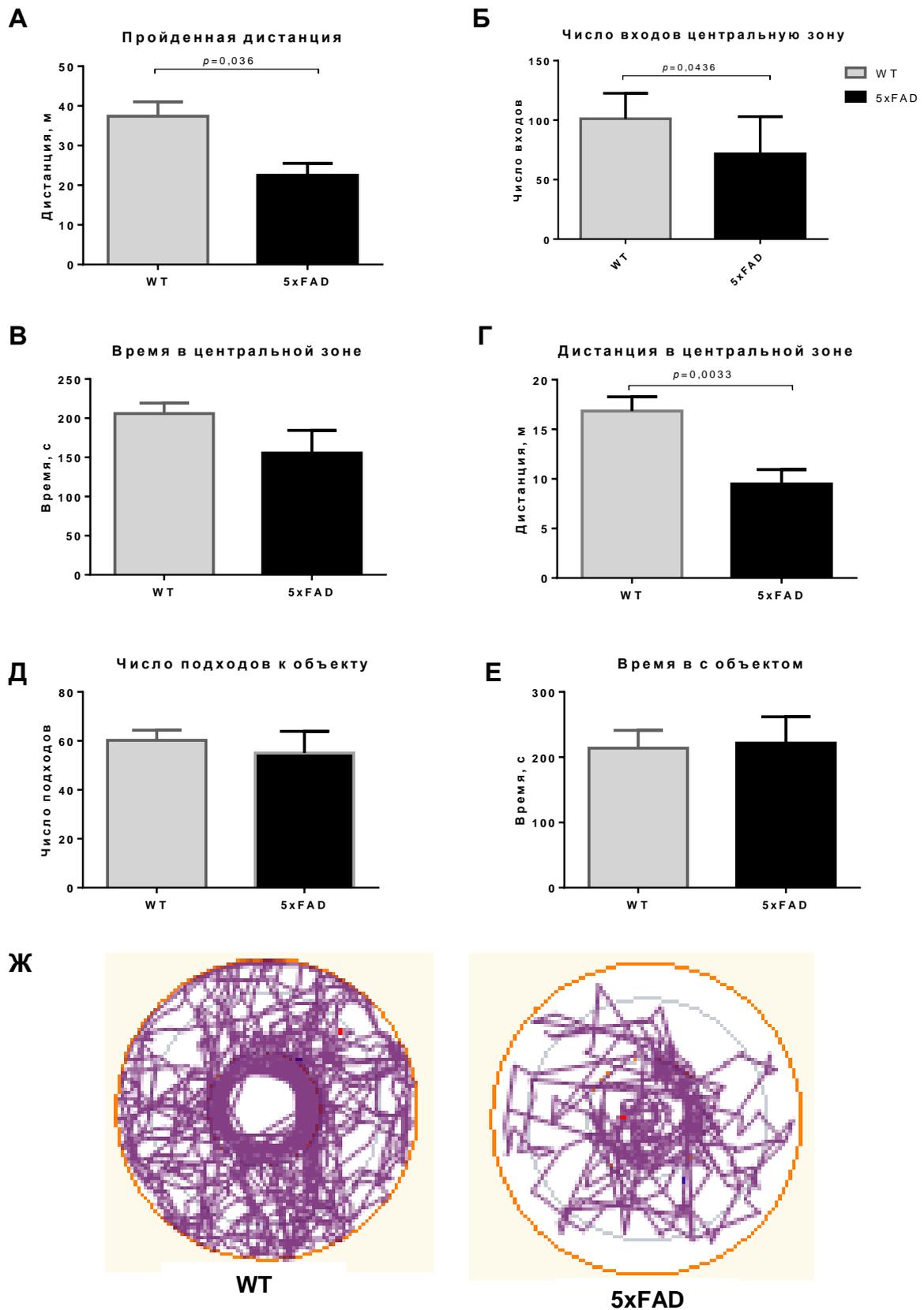


Рисунок 99 – Вторая сессия теста «Открытое поле». (А) – Пройденная дистанция, м; (Б) – Число входов в центральную зону; (В) – Время в центральной зоне; (Г) – Дистанция в центральной зоне; (Д) – Число подходов к несоциальному объекту; (Е) – Время с несоциальным объектом; (Ж) – Треки движения в тесте «Открытое поле». WT – контрольные мыши дикого типа; 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера.

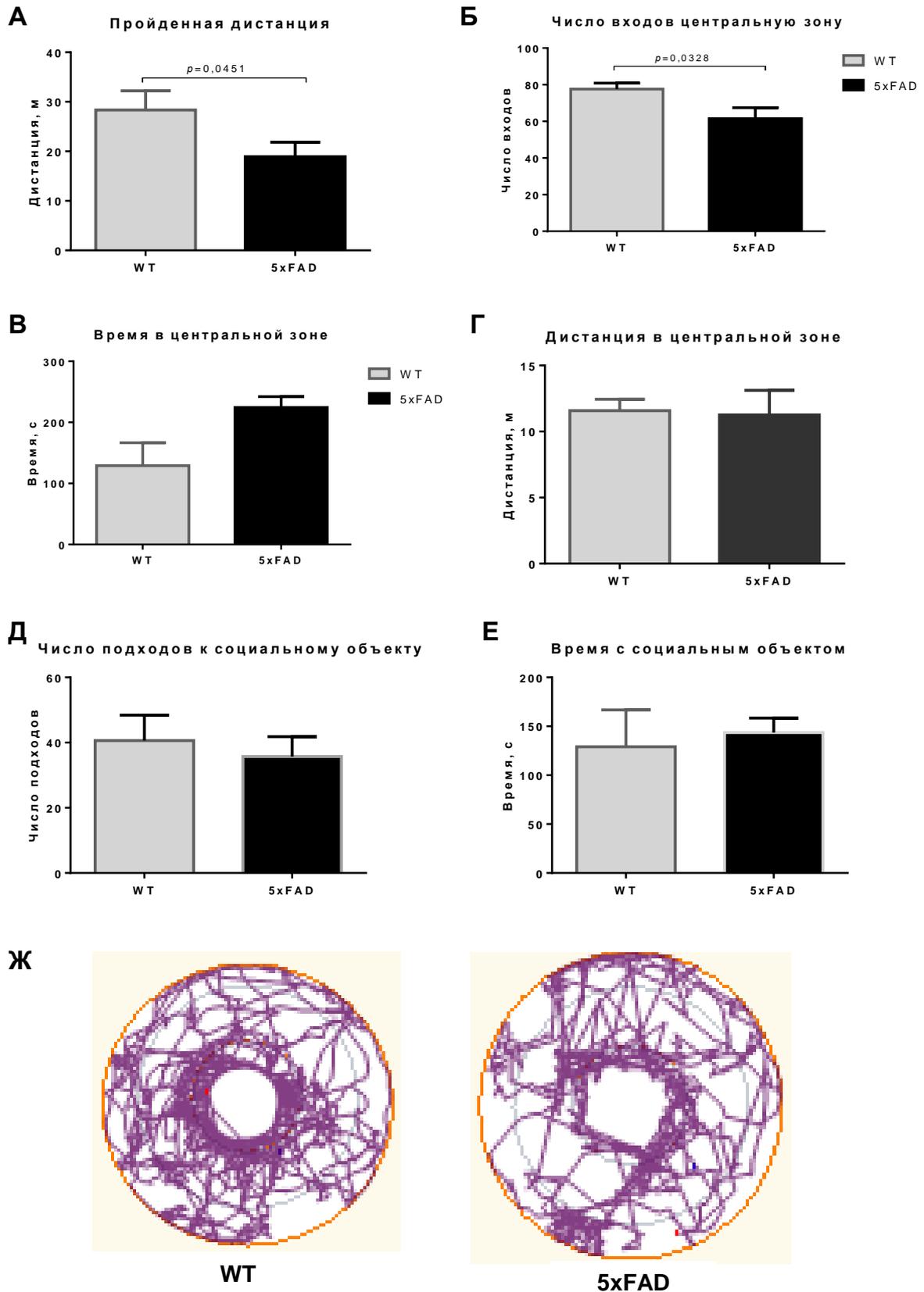


Рисунок 100 – Третья сессия теста «Открытое поле». (А) – Пройденная дистанция, м; (Б) – Число входов в центральную зону; (В) – Время в центральной зоне; (Г) – Дистанция в центральной зоне; (Д) – Число подходов к социальному объекту; (Е) – Время с социальным объектом; (Ж) – Треки движения в тесте «Открытое поле». WT – контрольные мыши дикого типа; 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера.

3.10.4.2. Поведенческая оценка эмоциональной ранней и отсроченной памяти у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (5xFAD)

Мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия B6SLJ - Tg(APP^SwF1^{Lon},PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799^{Vas}) тестировали в тесте «Условно-рефлекторного замирания» для оценки недавней и отсроченной памяти. В качестве контроля использовали мышей с генетическим фоном C57Bl6.

Оценивали время замирания в каждый день тестируемый день с течением предъявляемых стимулов (день создания условий для замирания и сигнальный день), а также с течением времени (контекстный день).

С этой целью использовался двухфакторный дисперсионный анализ с целью выявления влияния фактора генотипа и предъявляемых стимулов/времени.

В первый день был проанализирован процент замирания у 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). В первый день тестирования мы отметили статистически значимое влияние предъявляемых с течением времени стимулов ($F(3,24) = 26,08, p < 0,0001$), при этом не было обнаружено статистически значимого влияния генотипа ($F(1,8) = 1,371, p = 0,2753$), а также значимого влияния взаимосвязи двух факторов ($F(3,24) = 0,5626, p = 0,6449$) (Рисунок 101). Однако при множественном сравнении групп животных между собой с использованием *post-hoc* Sidak's критерия не выявили различия в проценте замирания у мышей контрольной группы и трансгенных мышей с БА до предоставления стимула «*Pre-tone*». Такая же тенденция сохраняется и при предоставлении стимулов CS-US1, CS-US2 и CS-US3. 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. Такое приобретение памяти связано в первую очередь с гиппокампом. Так показано, что процент замирания у 5xFAD трансгенных мышей не отличается при сравнении CS-US1 ($41,03 \pm 4,37\%$) и CS-US3 ($50,57 \pm 5,24\%$) ($p=0,8876$, Sidak's критерий), что, скорее всего, можно интерпретировать как нарушение приобретения ассоциированной с белым шумом памяти страха. У животных контрольной группы наблюдалась следующая динамика данного процесса: процент замирания у C57Bl6 мышей статистически значимо отличается при сравнении CS-US1 ($43,5 \pm 3,35\%$) и CS-US3 ($63,08 \pm 7,54\%$) ($p=0,0376$, Sidak's критерий).

Кривая обучения (1 день)

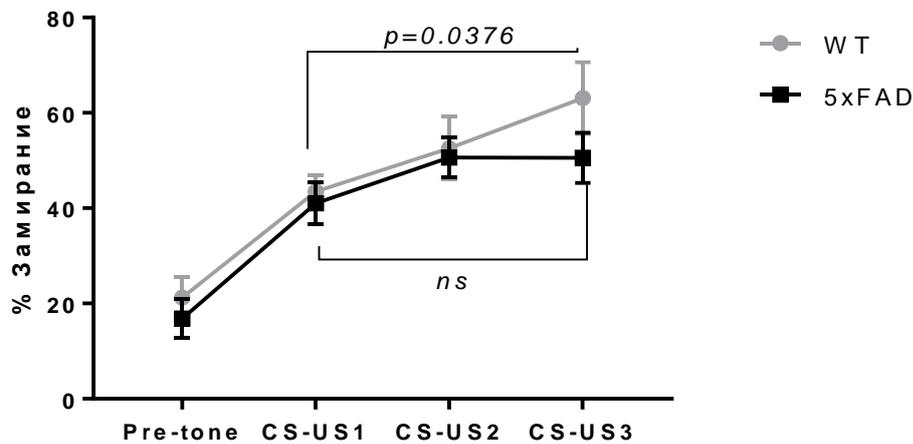


Рисунок 101 – Кривая обучения в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». Pre-tone – до подачи белого шума, CS-US1 – первая пара стимулов, CS-US2 – вторая пара стимулов, CS-US3 – третья пара стимулов. WT – контрольные мыши дикого типа, 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера, ns – незначимо.

Таким образом, не выявлено нарушений на этапе приобретения памяти у контрольной группы, однако, 5xFAD трансгенных мышей наблюдаются нарушения этапа приобретения памяти, ассоциированного с гиппокампом.

Во второй день оценивали контекстуальную память при отсутствии каких-либо 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 ($F(1,14) = 23,48$, $p=0,0003$), и времени ($F(4,56) = 10,21$, $p<0,0001$), а также

значимое влияние взаимосвязи двух факторов ($F(4,56) = 7,492$, $p < 0,0001$) (двухфакторный ANOVA) (Рисунок 102). При последующем множественном сравнении с помощью критерия Sidak's отметили статистически значимые различия между точками двух групп. При сравнении % замирания с течением времени выявили, что с первой по четвертую минуту мыши с генетической болезнью Альцгеймера замирали меньше по сравнению с контрольными: на первой минуте $71,5 \pm 4,41\%$ и $87,33 \pm 2,15\%$ соответственно ($p = 0,0002$); на второй минуте $81,56 \pm 5,56\%$ и $94,28 \pm 1,62\%$ соответственно ($p = 0,0044$); на третьей минуте $81,22 \pm 5,09\%$ и $93,67 \pm 1,08\%$ соответственно ($p = 0,0056$); и $71,28 \pm 9,73\%$ и $93,57 \pm 1,65\%$ соответственно ($p < 0,0001$); на пятой минуте различий не было выявлено ($p = 0,9995$).

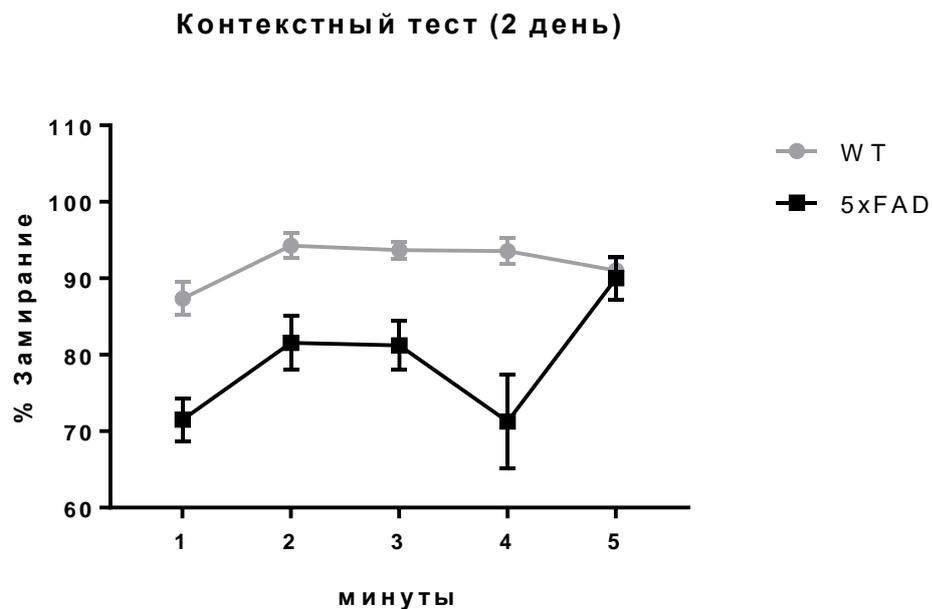


Рисунок 102 – Процент замирания во второй контекстный день (кратковременная память). WT – контрольные мыши дикого типа, 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера.

На третий день тестирования в условиях новой среды у контрольной группы мышей, и мышей с генетической моделью фиксировался процент времени замирания до предоставления слухового стимула «*Pre-tone*» и после предоставления такого стимула «*Tone*». Было отмечено статистически значимое влияние взаимосвязи двух факторов (генотипа и тона) ($F(1,28) =$

40,35, $p < 0,0001$), а также каждого фактора в отдельности: генотипа ($F(1,28) = 114,4$, $p < 0,0001$), и тона ($F(1,28) = 40,29$, $p < 0,0001$) (двухфакторный дисперсионный анализ) (Рисунок 103).

Весьма интересным оказался график процента замирания в третий сигнальный день: трансгенные мыши до предъявления стимула в виде белого шума замирают практически в течение всего времени тестирования ($98,46 \pm 0,71\%$), тогда как мыши контрольной группы статистически значимо меньше ($65,73 \pm 2,08\%$) ($p < 0,0001$). После предъявления стимула в виде шума трансгенные мыши сохраняют высокий уровень замирания ($98,45 \pm 0,85\%$), что скорее всего связано не с извлечением памяти, а с общей повышенной тревожностью, поскольку этот показатель не отличается от процента замирания до предъявления шума. При этом у контрольных мышей происходит статистически достоверное увеличение времени замирания в ответ на предъявляемый шум, что может быть использовано для оценки извлечения памяти. После предъявления стимула в виде шума контрольные мыши замирали дольше ($90,1 \pm 1,97\%$) по сравнению с временем замирания до стимула ($65,73 \pm 2,08\%$) ($p < 0,0001$).

Сигнальный тест (3 день)

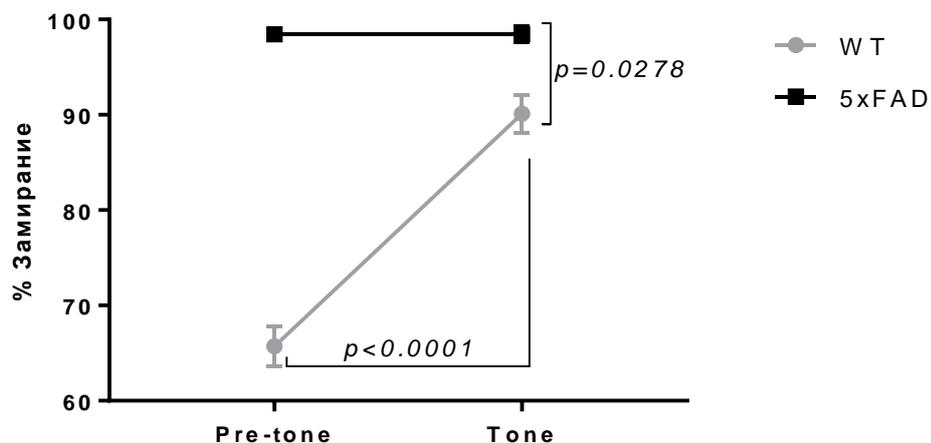


Рисунок 103 – Процент замирания в третий сигнальный день. Pre-tone – до подачи белого шума, Tone – подача белого шума. WT – контрольные мыши дикого типа, 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера.

Для оценки отсроченной памяти у мышей мы оценивали процент времени замирания при помещении их в контекст без подачи стимулов на 7 день после создания условий для замирания и при помещении в новые условия (сигнальный день) с подачей белого шума на 8 день после кондиционирования.

При изучении времени замирания в контекстный день выявили значимое влияние взаимодействия двух факторов (генотипа и фактора времени ($F(4,56) = 2,736, p=0,0376$), а также каждого фактора по отдельности – генотипа ($F(1,14) = 18,16, p=0,0007$), фактора времени – ($F(4,56) = 8,156, p<0,0001$) (Рисунок 104). Обращает внимание и то, что мыши контрольной группы сразу же распознают предъявляемый контекст как опасный, что проявляется увеличенным процентом замирания в каждую минуту теста.

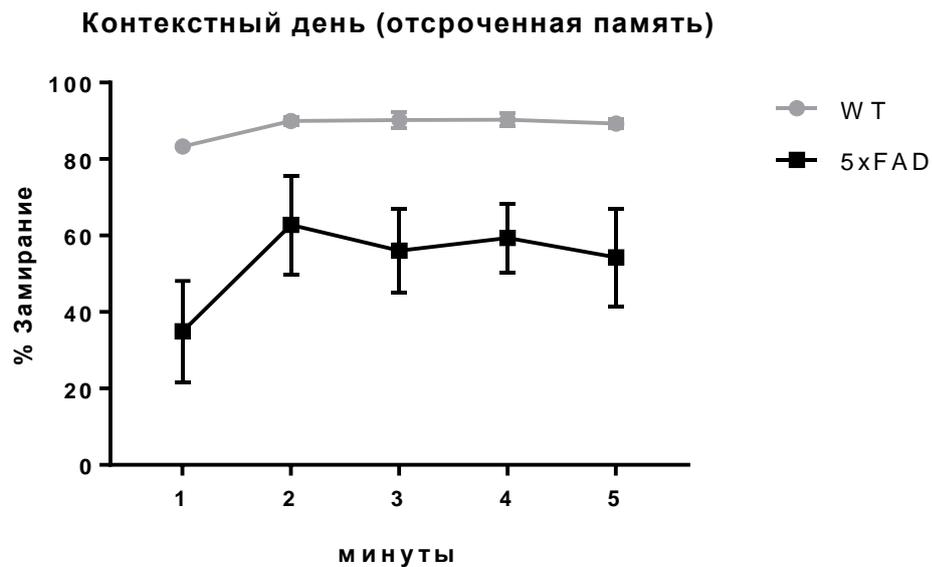


Рисунок 104 – Процент замирания в контекстный день (отсроченная память – 7 день). WT – контрольные мыши дикого типа, 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера.

В сигнальный день было выявлено значимого влияние подаваемого тона ($F(1,2) = 4,217, p=0,0498$), а также взаимодействия двух факторов ($F(1,27) = 4,54, p=0,0424$). При множественном попарном сравнении групп выявили, что у контрольной группы время замирания увеличивается при предоставлении стимула в виде шума ($90,28 \pm 1,84\%$) по сравнению изначальным временем

замирания до предъявления шума ($77,74 \pm 2,36\%$) ($p=0,014$ Sidak's критерий), что свидетельствует о сохранении приобретенной ассоциативной связи с белым шумом. У группы мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера такой разницы во времени замирания отмечено не было: время до предоставления слухового стимула в новом контексте составило ($84,84 \pm 2,97\%$), после – ($84,61 \pm 5,07$) ($p>0,9999$, Sidak's критерий) (Рисунок 105).

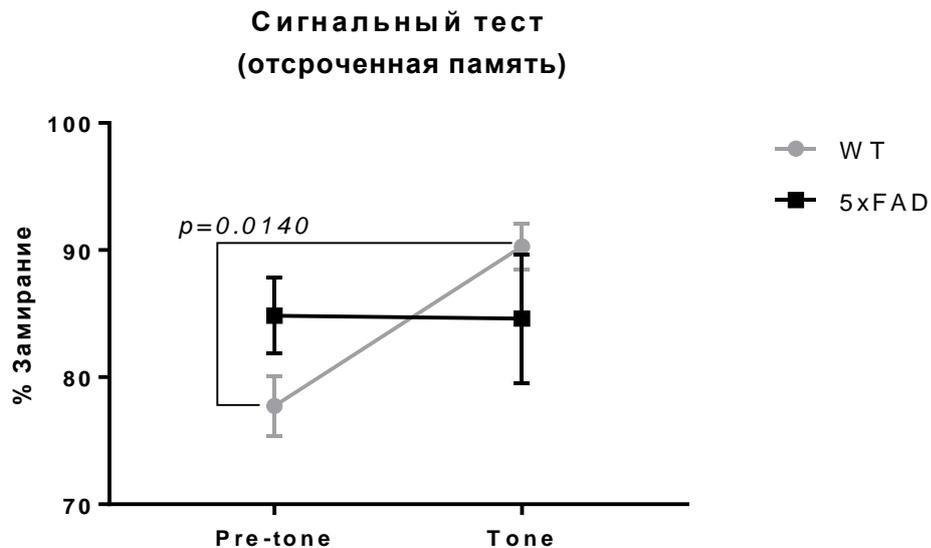


Рисунок 105 – Процент замирания в сигнальный день (отсроченная память – 8 день). Pre-tone – до подачи белого шума, Tone – подача белого шума. WT – контрольные мыши дикого типа, 5xFAD – трансгенные мыши с болезнью Альцгеймера.

Таким образом, полученные при анализе поведения данные свидетельствуют о наличии дефектов ассоциативного обучения и запоминания у мышей с генетической болезнью Альцгеймера, что проявляется нарушениями как недавней, так и отсроченной памяти.

3.10.5. Поведенческая оценка рабочей памяти у мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера с введением растворимых форм олигомеров бета-амилоида 1-42

Как уже было описано ранее с целью изучения рабочей памяти, а также внимания, тревоги, предпочтения новизны может быть использован тест «Распознавание нового объекта» [30].

Для количественной оценки в тесте были использованы следующие индексы – индекс различия (DI), который позволяет различать новые и знакомые объекты [30]; индекс распознавания (RI), т. е. коэффициентом, отражающим время, потраченное на исследование нового объекта относительно общего времени исследования объектов [56].

Индекс различий у мышей с моделированием болезни Альцгеймера ($-0,61 \pm 0,13$), что статистически значимо меньше, чем у животных контрольной группы с введением PBS ($0,21 \pm 0,09$) ($p=0,0006$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 106). Отрицательное значение данного индекса у мышей опытной группы (C57Bl6+A β) указывает на большее время, проведенное с уже знакомым объектом. Поскольку новые стимулы могут изменять поведение животных, вызывать стрессовые реакции, такой результат указывает, что животные экспериментальной группы испытывают стресс новизны [30].

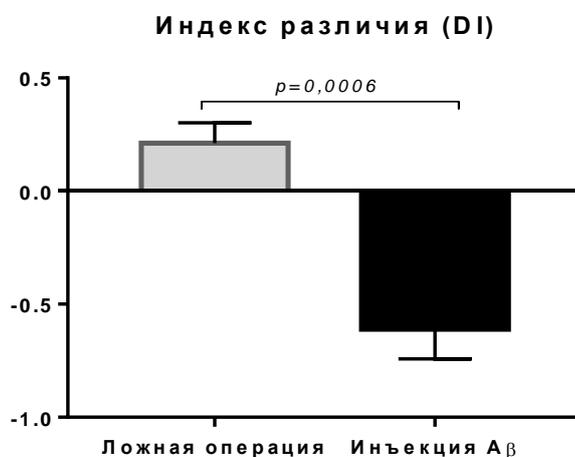


Рисунок 106 – Индекс различия (Discrimination Index, DI).

При анализе индекса распознавания (RI) отметили, что данный показатель был выше почти в три раза у мышей контрольной группы после введения фосфатно-солевого буфера ($0,56 \pm 0,15$) в сравнении с мышами с моделированием болезни Альцгеймера ($0,19 \pm 0,06$) ($p=0,0012$, критерий Манна-Уитни), что характеризует более высокую способность запоминать у мышей контрольной группы, чем у мышей после введения бета-олигомеров (Рисунок 107).

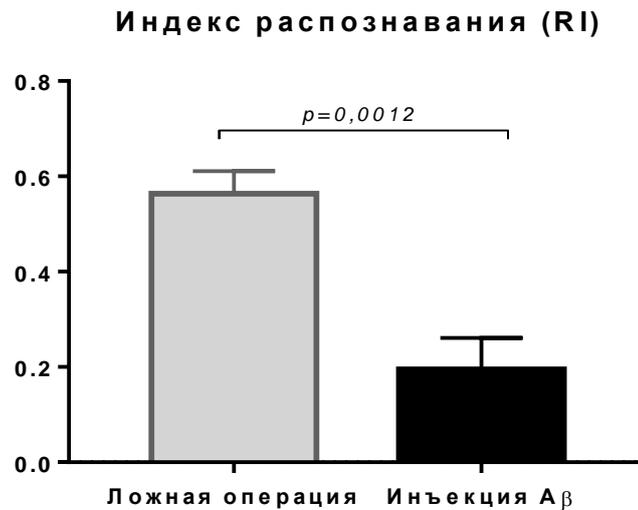


Рисунок 107 – Индекс распознавания (Recognition Index, RI).

3.10.6. Поведенческое фенотипирование мышей нокаутных по гену *Nlrp3* (*Nlrp3*^{-/-})

3.10.6.1. Поведенческая оценка тревожности у мышей нокаутных по гену *Nlrp3* (*Nlrp3*^{-/-})

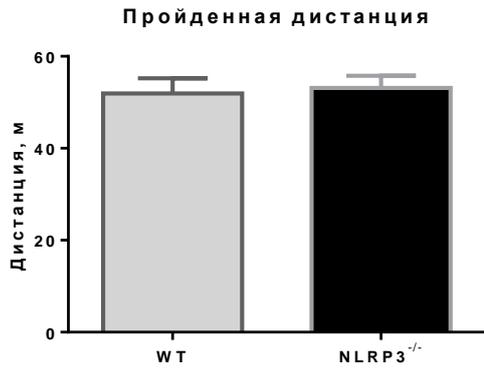
Было установлено, что удаление *Nlrp3* гена усилило тревожное поведение у мышей. Когда мышам исполнилось 4 месяца, они впервые были проверены на локомоторную активность на арене открытого поля. Не было обнаружено существенных различий по общей дистанции, пройденной в открытом поле в группах контроля и *Nlrp3*^{-/-}, что свидетельствует о том, что общая двигательная активность была одинаковой у всех мышей (Рисунок 108). Однако делеция *Nlrp3* увеличивает поведение, связанное с тревогой, в парадигме открытого поля. В открытом поле, чтобы исследовать боязнь и эмоциональность, была измерена продолжительность времени, проведенного в центральной зоне, количество входов и пройденное расстояние в центральной зоне и обнаружили значительные различия между группами. Таким образом, время, проведенное в центре арены, было значительно снижено в группе *Nlrp3*^{-/-} по сравнению с контролем (75,33±8,23 и 173,7±9,51 (с), соответственно, $p < 0,0001$, критерий Манна-Уитни). Что касается числа входов в центральную часть открытого поля наблюдалось статистически значимо меньше в группе *Nlrp3*^{-/-}, чем в контрольной группе WT (59,1±6,5 и 99,7±4,82, соответственно, $p = 0,0007$, критерий Манна-Уитни). Дистанция, пройденная в центральной зоне, была больше в группе WT (17,67 ± 0,99 (м)) по сравнению с мышами *Nlrp3*^{-/-} (9,69 ± 1,066 (м)) ($p = 0,0002$, критерий Манна-Уитни).

Чтобы определить боязнь новизны, новый несоциальный (неживой) объект был помещен в центр арены открытого поля и оценивалось время, проведенное с объектом; время, проведенное в центре, и количество входов в зону, где был расположен новый объект (Рисунок 109). Не выявлено статистически значимой разницы между группами во времени, проведенном в

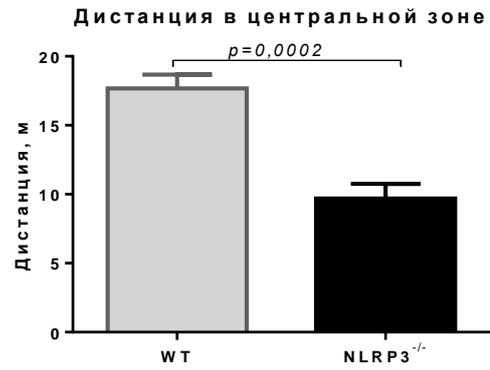
центральной зоне ($p=0,1615$, критерий Манна-Уитни). Однако мыши из группы $Nlrp3^{-/-}$ проводили меньше времени с новым объектом относительно группы контроля ($109,7\pm 13,59$ и $213,8\pm 27,28$ (с) соответственно) ($p=0,004$, критерий Манна-Уитни). Несмотря на меньшее время, проведенное с новым объектом, не наблюдалось существенной разницы в количестве входов в зону с новым объектом у мышей $Nlrp3^{-/-}$ ($p=0,2132$, критерий Манна-Уитни). Такой фенотип может указывать на повышенную боязнь у $Nlrp3^{-/-}$ мышей.

Для анализа интереса к социальному объекту был осуществлен следующий шаг: в центр арены поместили социальный объект (живой объект, другую особь) (Рисунок 110). Была обнаружена сходная тенденция с социальным объектом, как и в тесте с несоциальным объектом. В частности, $Nlrp3^{-/-}$ мыши прошли меньшее расстояние в центральной зоне ($8,68\pm 0,69$ (м)) по сравнению с WT мышами ($11,58\pm 0,87$ (м)) ($p=0,0420$). Однако не было значительной разницы между двумя генотипами во времени, проведенном с социальным объектом, и подходами к социальному объекту. Таким образом, мы можем предположить, что у мышей с делецией гена $Nlrp3^{-/-}$ наблюдается тревожное поведение, в то время как социализация не нарушалась. Эти результаты должны были быть подтверждены другими тестами, поэтому были проведены другие исследования поведения, чтобы проверить предположения.

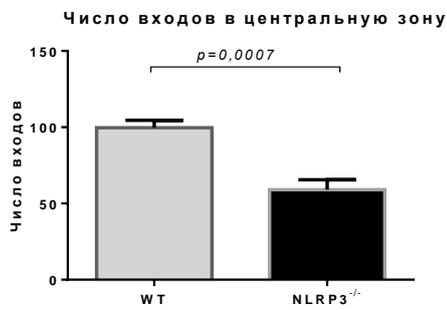
А



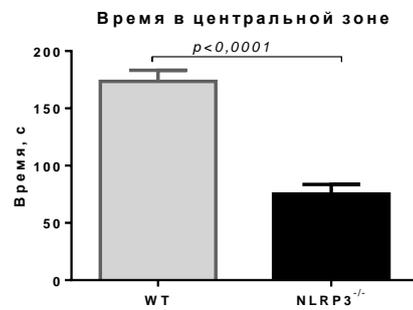
Б



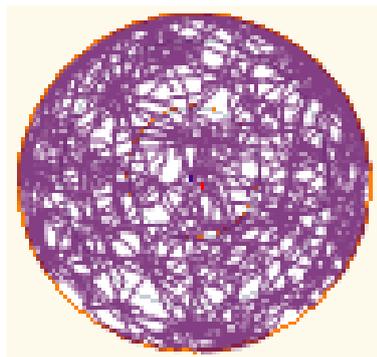
В



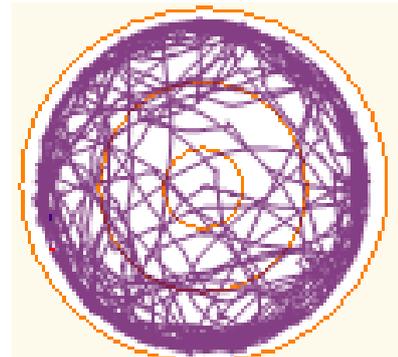
Г



Д



WT



NLRP3KO

Рисунок 108 – (А-Г) Результаты тестирования в тесте «Открытое поле». Первая 10-минутная сессия. Д – треки движения в тесте. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

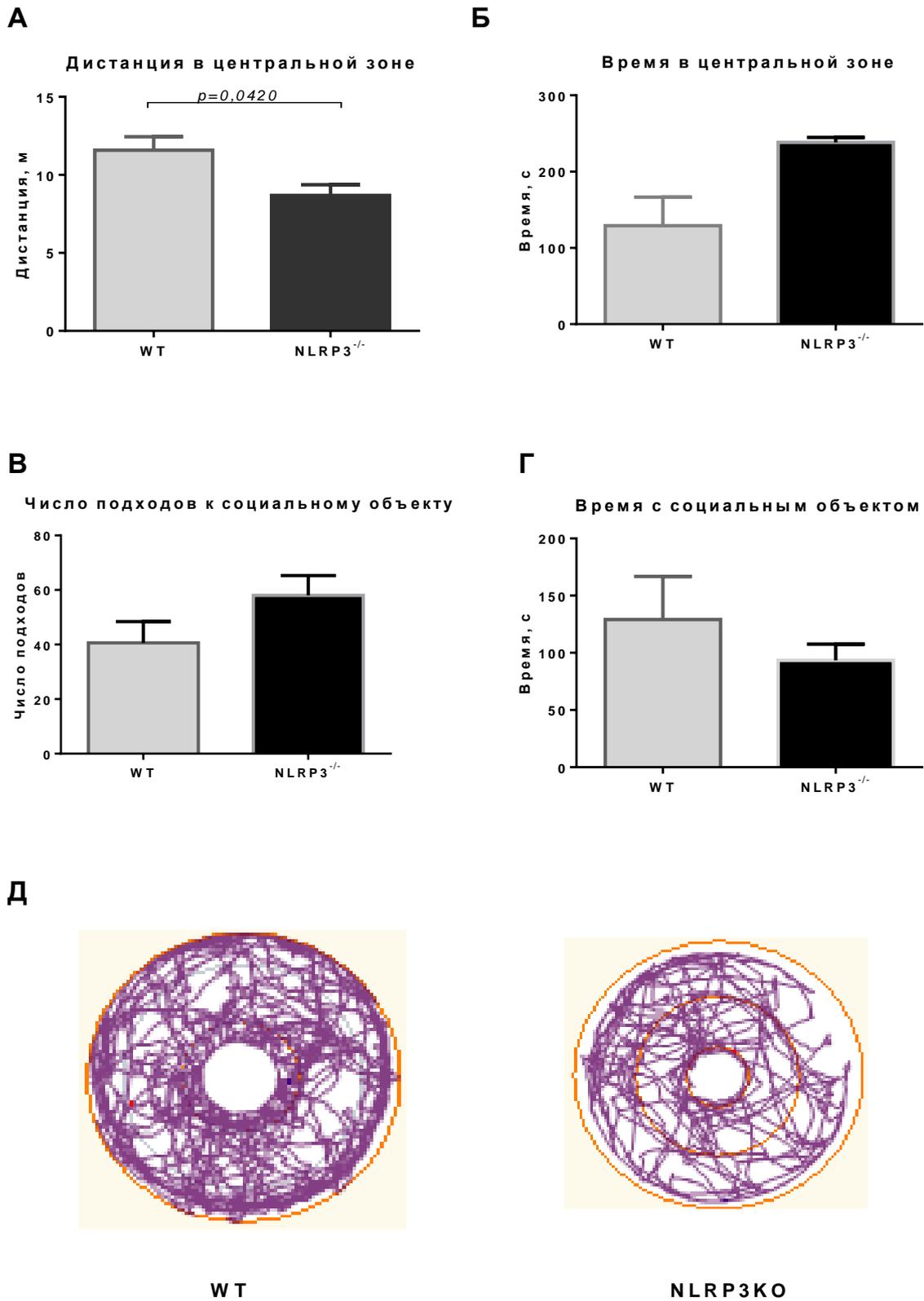


Рисунок 110 – (А-Г) Результаты тестирования в тесте «Открытое поле». Третья 10-минутная сессия с социальным (живым объектом в центре). Д – треки движения в тесте. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

Таким образом, для более точного определения связанных с тревогой фенотипа мыши были протестированы в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (Рисунок 111). Результаты данного теста показали, что у *Nlrp3*^{-/-} мышей общая дистанция была значительно ниже ($11,46 \pm 1,33$ (м)), чем у WT ($28,43 \pm 3,89$ (м)) ($p=0,0016$, критерий Манна-Уитни). Наблюдаются существенные различия в пройденном расстоянии в закрытых руках: у *Nlrp3*^{-/-} мышей ($7,67 \pm 1,04$ м), у WT ($21,78 \pm 2,35$) ($p=0,0016$, критерий Манна-Уитни). Кроме того, наблюдали, что *Nlrp3*^{-/-} мыши проводили меньше времени в открытых руках ($35,3 \pm 5,13$ с) по сравнению с мышами WT ($74,26 \pm 21,4$ с) ($p=0,1601$) и продемонстрировали более низкий процент входов в открытые рукава ($20,68 \pm 1,98$) и ($29,07 \pm 4,67$) для группы *Nlrp3*^{-/-} и WT мышей соответственно ($p=0,0909$), а также дистанция, пройденная в открытых руках, была меньше у *Nlrp3*^{-/-} мышей ($0,94 \pm 0,25$ (м)) по сравнению с группой WT ($3,7 \pm 1,23$) ($p=0,0667$, критерий Манна-Уитни), но эти результаты не были статистически значимыми.

Интересным было наблюдение значительного увеличения времени, проведенного в центре лабиринта (Рисунок 112). Таким образом, *Nlrp3*^{-/-} мыши оставались более длительное время ($226,5 \pm 27,24$ с) в точке, где начинался тест, по сравнению с мышами WT ($107,9 \pm 14,51$) ($p=0,0062$, критерий Манна-Уитни), которые предпочитали исследовать лабиринт. В пользу этого факта также является уменьшение общего количества входов в открытые и закрытые руки у *Nlrp3*^{-/-} мышей ($43,43 \pm 2,76$), тогда как у WT этот параметр был значительно больше ($60,2 \pm 7,8$) ($p=0,048$, критерий Манна-Уитни). Таким образом, логично предположить, что у нокаутированных по *Nlrp3* гену животных наблюдается не только повышенная тревожность, подтвержденная во время тестирования в открытом поле, но и страх перед новизной и новым окружением. Для подтверждения данных результатов был проведен еще один тест для определения тревожности и страха обучения – «Черно-белая камера».

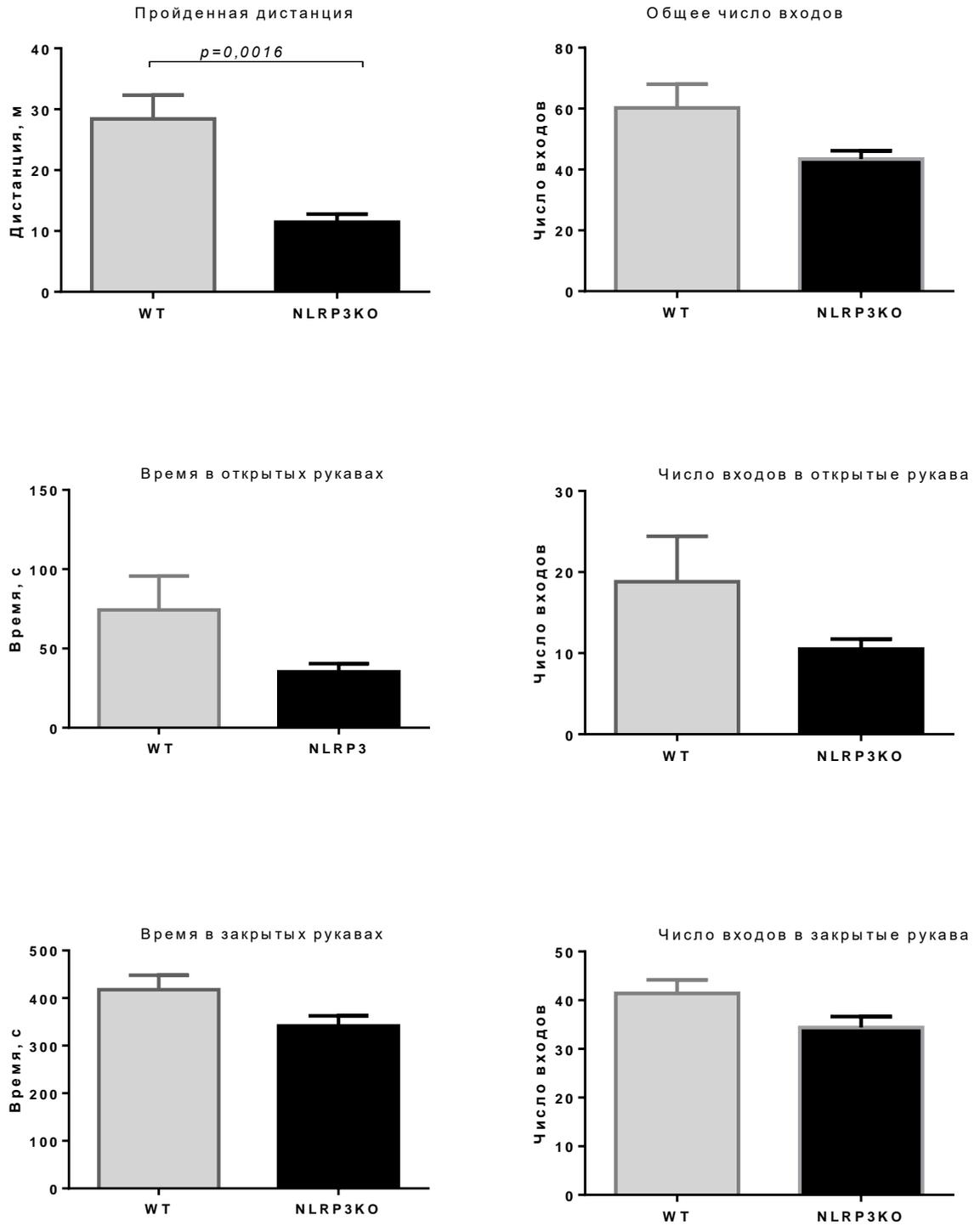


Рисунок 111 – Результаты тестирования в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

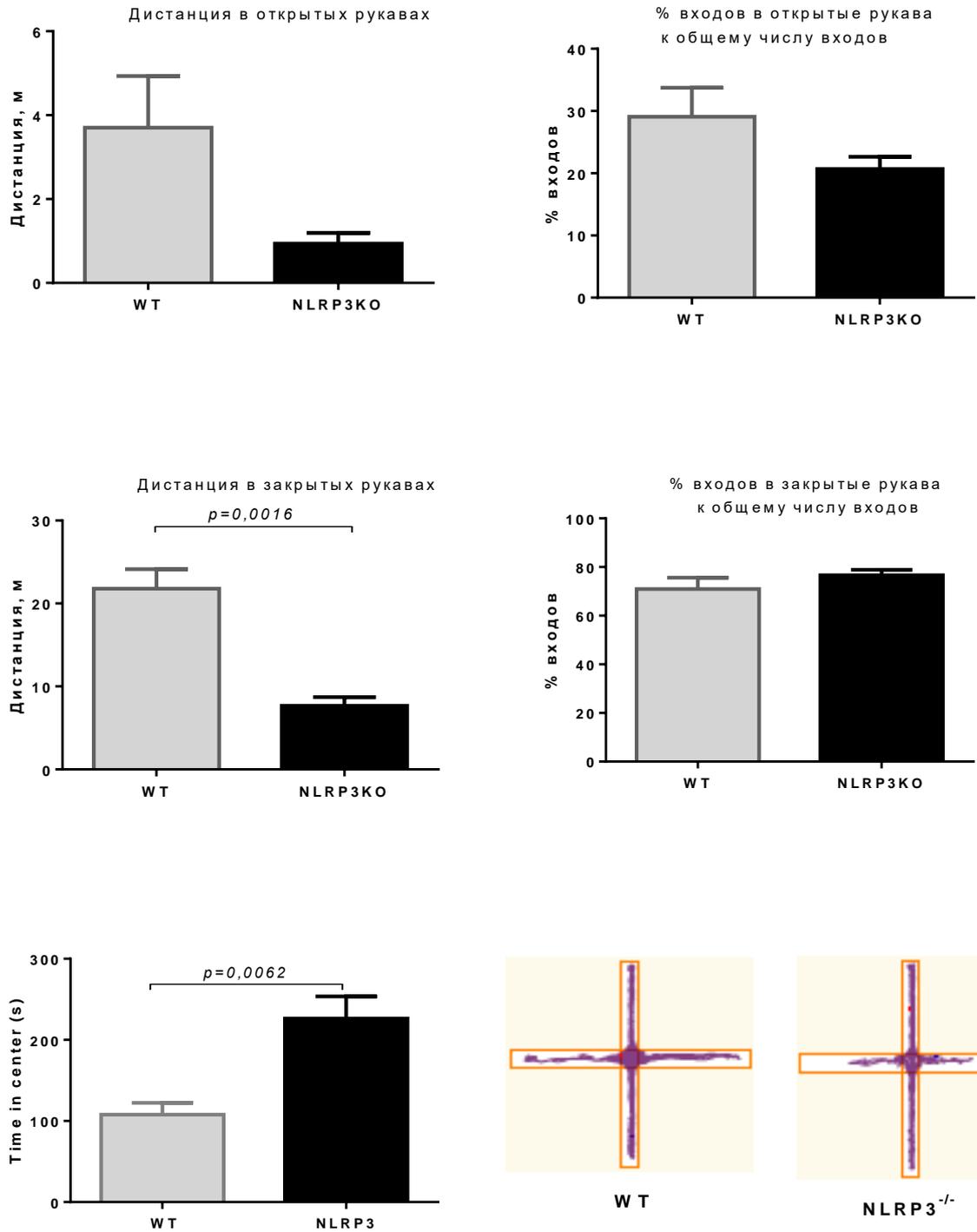


Рисунок 112 – Результаты тестирования в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

В тесте «Темно-светлая камера» используется постулат о том, что несмотря на то, что мыши имеют общее предпочтение оставаться в темной камере, тем не менее они обладают врожденным стремлением исследовать открытую освещенную область [336]. Как *Nlrp3^{-/-}* мыши, так и WT демонстрируют такое предпочтение, проводя больше времени в темных отсеках (Рисунок 113). Однако *Nlrp3^{-/-}* мыши провели больше времени в темной камере ($457 \pm 10,59$ (с)) по сравнению с мышами WT ($398,1 \pm 18,47$ (с)) ($p=0,0157$). Также мыши с делецией гена *Nlrp3* проводили значительно меньше времени в светлом отсеке ($141,9 \pm 10,58$ (с) и $201,8 \pm 18,43$ (с) у *Nlrp3^{-/-}* мышей и контрольных мышей соответственно) ($p=0,016$). В соответствии со временем, проведенным в светлом отсеке, расстояние в этой части камеры было значительно ниже у *Nlrp3^{-/-}* и в среднем составило $7,44 \pm 0,5$ (м), в то время как у WT мышей этот параметр был выше – $12,55 \pm 1,57$ (м) ($p=0,012$). У *Nlrp3^{-/-}* мышей латентное время входа в светлую зону было почти в два раза меньше – $8,15 \pm 1,13$ (с) по сравнению с группой контроля $15,18 \pm 3,31$ (с) ($p=0,0443$). Такой фенотип подтверждает повышенную тревогу у нокаутированных по *Nlrp3* гену мышей, а также наличие у них страха новизны.

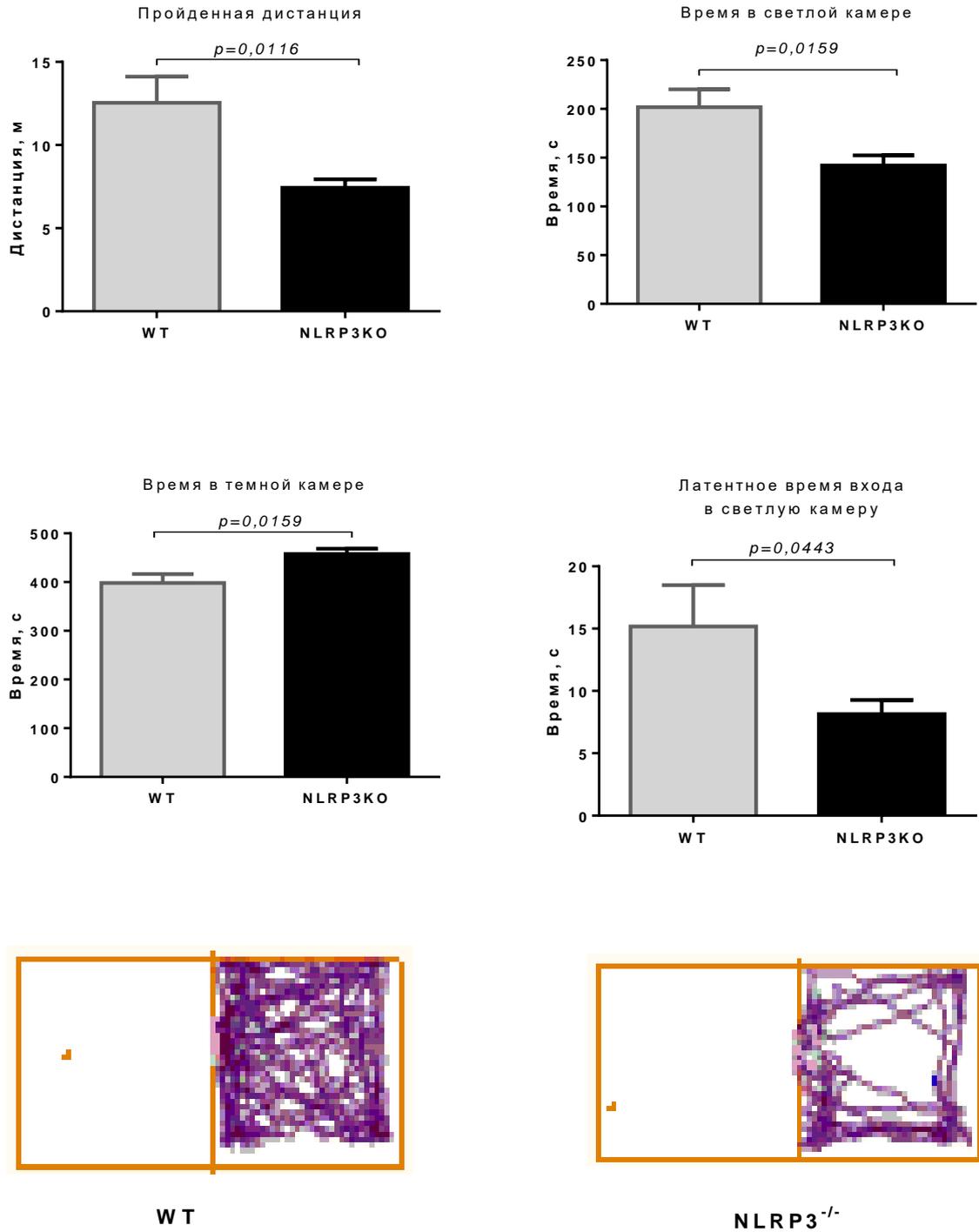


Рисунок 113 – Результаты тестирования в тесте «Темно-светлая камера». WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

3.10.6.2. Поведенческая оценка социального поведения у мышей нокаутных по гену *Nlrp3* (*Nlrp3*^{-/-})

Для анализа социального поведения использовали тест «Трехкамерная активность». В ходе проведенного тестирования было установлено, что удаление гена *Nlrp3* не влияет на социальное поведение, но уменьшает социальное предпочтение новизны.

Мышей тестировали в трехкамерном аппарате для анализа социальных взаимодействий. Социализация определяется когда экспериментальная мышь проводит больше времени в отсеке, в котором находится новая особь, по сравнению с отсеком, содержащей неживой, но новый объект [238]. Анализ показал, что *Nlrp3*^{-/-} мыши проводили значительно больше времени в камере с социальным объектом ($284,5 \pm 28,63$ (с)), чем несоциальным ($154,3 \pm 19,01$ (с)) ($p=0,004$, критерий Манна-Уитни). Такая же тенденция проводить больше времени с социальными объектами, чем с неживым объектом была отмечена и группе контроля ($p=0,0038$). *Nlrp3*^{-/-} мыши и контрольная группа не отличались по времени, проведенному в отсеке с другой мышью в сравнении с отсеком с несоциальным объектом (Рисунок 114).

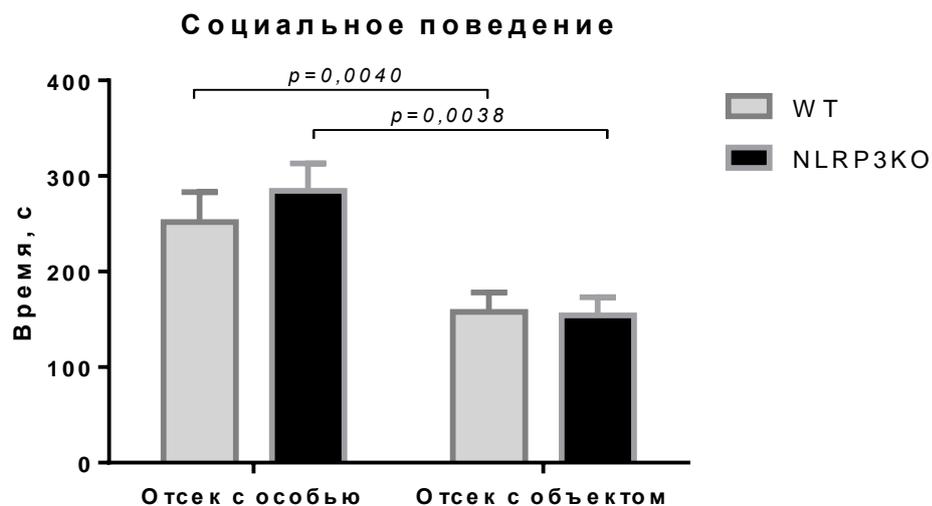


Рисунок 114 – Социальное поведение мышей, анализируемое в тесте «Трехкамерная активность». Время, проведенное в отсеке с неживым объектом и другой

особью. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

Эти результаты показывают, что нет влияния удаления гена *Nlrp3* на социальное поведение.

Затем у данных групп мышей в данном тесте оценивали предпочтение социальной новизны. Фиксировали время, проведенное с новой особью (особь 2) или знакомой из первой сессии особью (особь 1). Результаты показывают, что не было значимого различия у *Nlrp3*^{-/-} мышей по времени, проведенному в отсеках, содержащих либо особь 2 (179,2±21,03 (с)), либо особь 1 (162,1±23,4 (с)) соответственно ($p=0,46$, критерий Манна-Уитни). Эксперимент показал, что мыши контрольной группы проводили значительно больше времени с особью 2 (новой) по сравнению с *Nlrp3*^{-/-} мышами ($p=0,02$). Очевидно, что WT мыши проводили значительно больше времени с новой особью (249,4±18,62 (с)), чем со знакомой (168,7±21,33 (с)) ($p=0,0226$, критерий Манна-Уитни). Это показывает, что делеция гена *Nlrp3* снижала предпочтение социальной новизне, тогда как контрольная группа демонстрирует очевидные новые социальные предпочтения (Рисунок 115).

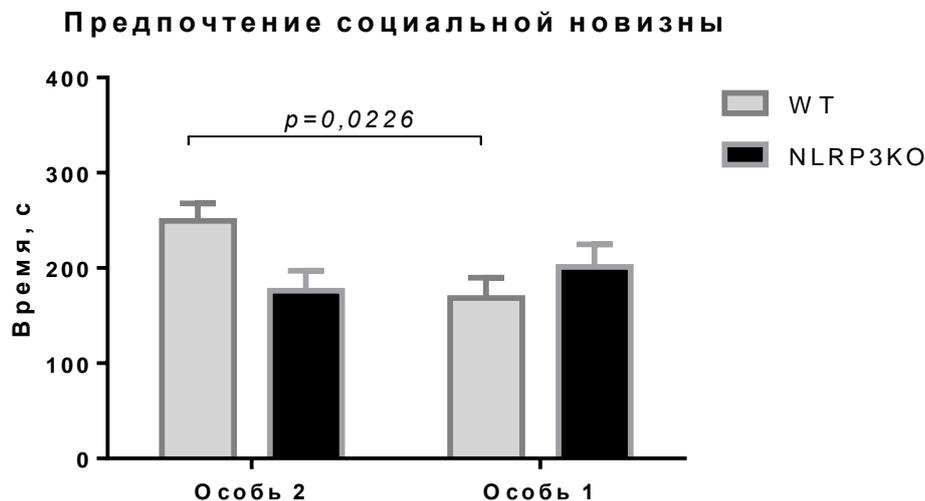


Рисунок 115 – Предпочтение социальной новизны, анализируемое в тесте «Трехкамерная активность». Время, проведенное в отсеке с новой особью (особь 2) и уже знакомой особью (особь 1). WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

3.10.6.3. Поведенческая оценка ранней эмоциональной памяти у мышей нокаутных по гену *Nlrp3* (*Nlrp3*^{-/-})

У мышей с нокаутированием гена *Nlrp3* (*Nlrp3*^{-/-}) изучали эмоциональную память путем исследования условного рефлекса страха. Для оценки недавней и отсроченной памяти в тесте «Условно-рефлекторного замирания» в первый день изучали приобретение памяти (кривая обучения) с последующим анализом контекстуальной и сигнальной памяти в ранний период (на 1-2 день после создания условий для замирания) и отсроченный период (на 7-8 день после создания условий для замирания). В качестве контроля использовали мышей с генетическим фоном C57Bl6.

Оценивали процент времени время замирания в каждый день тестируемый день и число эпизодов замирания. В первый день анализ проводили в различные временные интервалы для построения кривой обучения. В последующие дни анализ проводили за весь период времени [300].

В первый день тестирования была исследована динамика запоминания для построения кривой обучения. Для этого сначала измерили базальный уровень замирания до предъявления мышам пары согласованных стимулов (базальный уровень). Далее предъявляли в равные промежутки времени (120 с) пару стимулов (CS-US) с трехкратным повторением. Процент времени замирания фиксировали в каждый интервал. Также в каждый временной промежуток, включая базальный, оценивали число эпизодов замирания. В день создания условий для замирания было выявлено статистически значимое влияние фактора предъявления пары стимулов на замирание ($F(3,66) = 34,77$, $p < 0,0001$), а также статистически значимое влияние генотипа ($F(1,66) = 45,72$, $p < 0,0001$). Влияния взаимодействия двух факторов не обнаружено ($F(3,66) = 1,412$, $p = 0,2471$) (Рисунок 116). При последующем множественном сравнении для анализа динамики кривой обучения не было выявлено различий в проценте замирания на базальном уровне (до стимулов) у мышей контрольной

группы и *Nlrp3*^{-/-}. Также не отмечено статистически достоверной разницы при сравнении групп между собой в разные интервалы времени. Для характеристики кривой обучения (приобретения памяти) сравнили время замирания между интервалами времени подачи первой пары стимулов и третьей пары стимулов. Процент замирания у *Nlrp3*^{-/-} мышей отличается между первым интервалом времени (19,47±4,38%) и третьим (34,36±7,36%), но недостоверно ($p=0,4459$, Sidak's критерий). У животных контрольной группы наблюдалась следующая динамика данного процесса: процент замирания у C57Bl6 мышей статистически значимо отличается при сравнении первой пары стимулов CS-US1 (27,57±4,41%) и третьей CS-US3 (49,07±3,06%) ($p=0,0408$, Sidak's критерий). Таким образом, не выявлено нарушений на этапе приобретения памяти у контрольной группы. Мыши *Nlrp3*^{-/-} проявляли поведение, ассоциированное с нарушением этапов приобретения памяти.

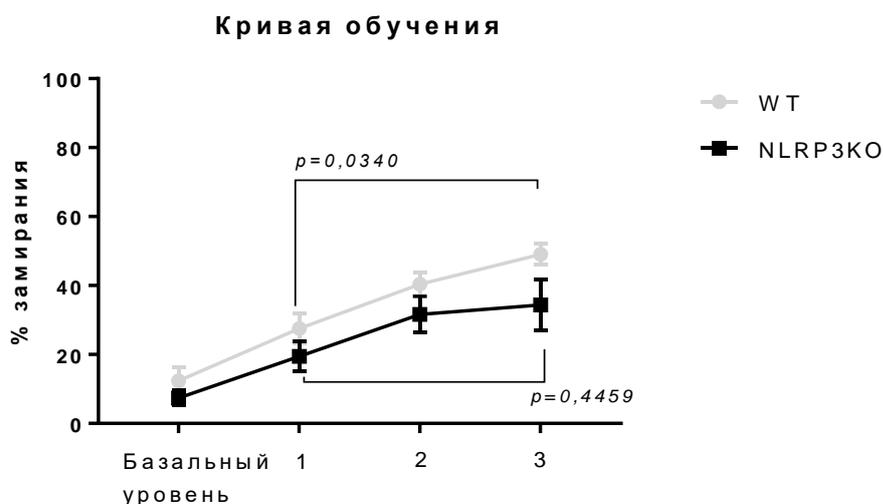


Рисунок 116 – Кривая обучения в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». Базальный уровень – до подачи белого шума, 1 – первая пара стимулов, 2 – вторая пара стимулов, 3 – третья пара стимулов. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

При оценке извлечения памяти в контексте (контекстуальной) оценили процент замирания у двух групп. Отмечено статистически значимое различие между группами *Nlrp3*^{-/-} и контрольными мышами. Мыши контрольной группы замирают дольше (66,01±2,78 %) по сравнению с *Nlrp3*^{-/-} (35,38±7,08 %) ($p<0,0001$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 117).

Контекстный тест (2 день)

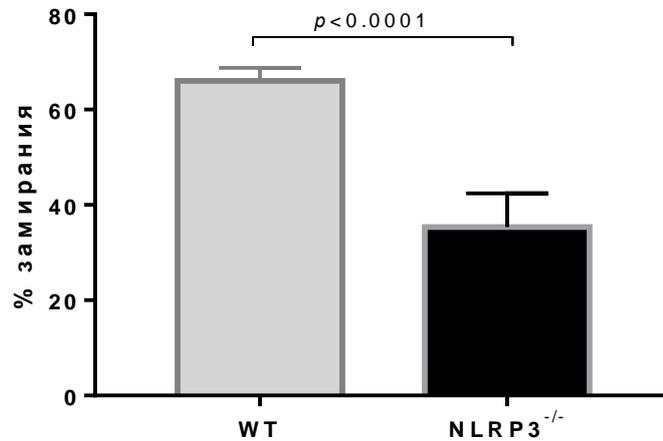


Рисунок 117 – Процент замирания во второй контекстный день (кратковременная память). WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

На третий день тестирования в абсолютно новых для мышей условиях фиксировался процент времени замирания – базальный и после сигнального извлечения памяти посредством подачи белого шума. Отметим статистически значимое влияние генотипа ($F(1,24) = 29,85, p < 0,0001$), а также фактора самого белого шума ($F(1,24) = 17,16, p = 0,0004$), (двухфакторный дисперсионный анализ) (Рисунок 118).

С помощью множественного анализа зафиксировали статистически значимые различия в базальном уровне замирания (при помещении в новую среду): у контрольной группы ($62,48 \pm 5,46$ %) и у *Nlrp3*^{-/-} группы ($42,55 \pm 6,83$ %) ($p = 0,0285$, Sidak's критерий). Также были обнаружены отличия после извлечения памяти посредством звукового воздействия: в группе контроля статистически значимо процент замирания выше ($86,13 \pm 1,77$ %) по сравнению с *Nlrp3*^{-/-} мышами ($56,48 \pm 1,69$ %) ($p = 0,0007$, Sidak's критерий). Сравнивая процент замирания в динамике (от базального и после предъявления звукового тона) в *Nlrp3*^{-/-} группе не было выявлено достоверных отличий ($p = 0,2169$, Sidak's критерий), что вероятно, является показателем отсутствия ассоциативной связи между шумом и потенциальной возможностью

воздействия электрического тока. В группе контроля эти параметры статистически значимо отличаются ($p=0,0069$, Sidak's критерий).

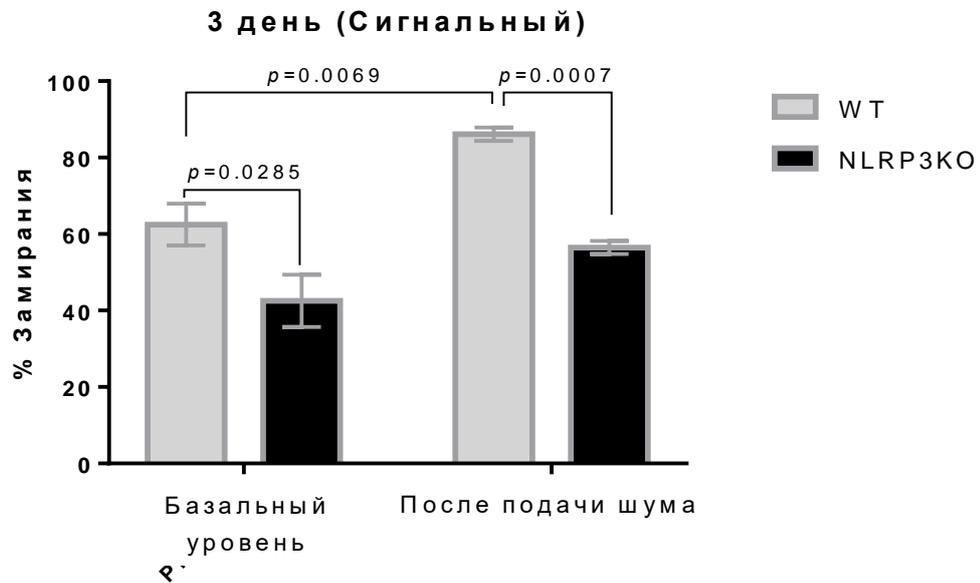


Рисунок 118 – Процент замирания в третий сигнальный день. Базальный уровень – до подачи белого шума. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*^{-/-}.

3.10.7. Поведенческая оценка эмоциональной памяти у мышей нокаутных по гену *Nlrp3* (*Nlrp3*^{-/-}) с введением растворимых форм Аβ1-42

Было проведено исследование формирования условного рефлекса страха в тесте «Условно-рефлекторное замирание» у *Nlrp3*^{-/-} мышей после моделирования болезни Альцгеймера с целью интерпретации влияния ранних изменений в головном мозге, вызванных инъекцией растворимых олигомеров Аβ1-42. В качестве контроля были использованы *Nlrp3*^{-/-} мыши с введением PBS, а также эксперимент был осуществлен на мышах C57Bl/6.

У мышей исследовали кривую обучения в первый день тестирования (Рисунок 119). Для анализа использовали многофакторный дисперсионный анализ, поскольку проводили изучение влияния нескольких факторов: *Генотипа*, *Операции*, *Интервала обучения*. При сравнении между собой групп *Nlrp3*^{-/-} с введением Аβ или PBS и C57Bl/6 с введением Аβ или PBS выявили статистически значимое влияние каждого из факторов по отдельности, также влияние взаимодействия данных факторов. Так влияние *Генотипа* ($F(1,24) = 6,011, p=0,0160$); влияние *Операции (введение Аβ или PBS)* ($F(1,24) = 17,53, p<0,0001$); влияние *Интервала обучения* ($F(2,24) = 41,29, p<0,0001$); влияние взаимодействия всех факторов *Генотипа, Операции, Интервала обучения* ($F(2,24) = 7,753, p=0,0008$).

При множественном сравнении с использованием критерия Tukey's изучили динамику обучения с каждым интервалом времени, в течение которого подавалась пара стимулов (белый шум и электрический ток). У животных дикого типа с введением PBS (C57Bl/6+PBS) отмечалась статистически достоверная разница времени замирания в промежутке между первым интервалом ($39,6 \pm 2,49$ %) стимулов и третьим ($59,32 \pm 6,0$ %) ($p=0,0012$), в то время как при введении бета-олигомеров WT мышам (C57Bl/6+Аβ) такой разницы обнаружено не было: мыши не проявляли различий во времени замирания в первый интервал подачи стимулов

(26,47±33,83 %) по сравнению с третьим (33,83±0,46 %) ($p=0,8776$). Также выявлены статистически значимые отличия между группами мышей дикого типа с введением PBS и олигомеров бета-амилоида в во втором интервале ($p<0,0001$) и в третьем интервале подачи стимулов ($p<0,0001$).

При тестировании формирования условного рефлекса страха у мышей с нокаутированием *Nlrp3* и проведением ложной операции обнаружено отличие во времени замирания на протяжении от первого (26,47±1,1 %) к третьему стимулу (40,11±4,83 %), но статистически недостоверно ($p=0,0820$). Однако, интересным было наблюдать, что у *Nlrp3*^{-/-} мышей при введении олигомеров Aβ1-42 такая разница (12,58±0,75 % в первом интервале и 41,44±2,46 % в третьем) была достоверна ($p<0,0001$). Таким образом, можно сказать, что введение бета-олигомеров с целью индукции нейровоспалительных реакций в головном мозге *Nlrp3*^{-/-} мышами не приводит к изменениям в формировании условного рефлекса страха.

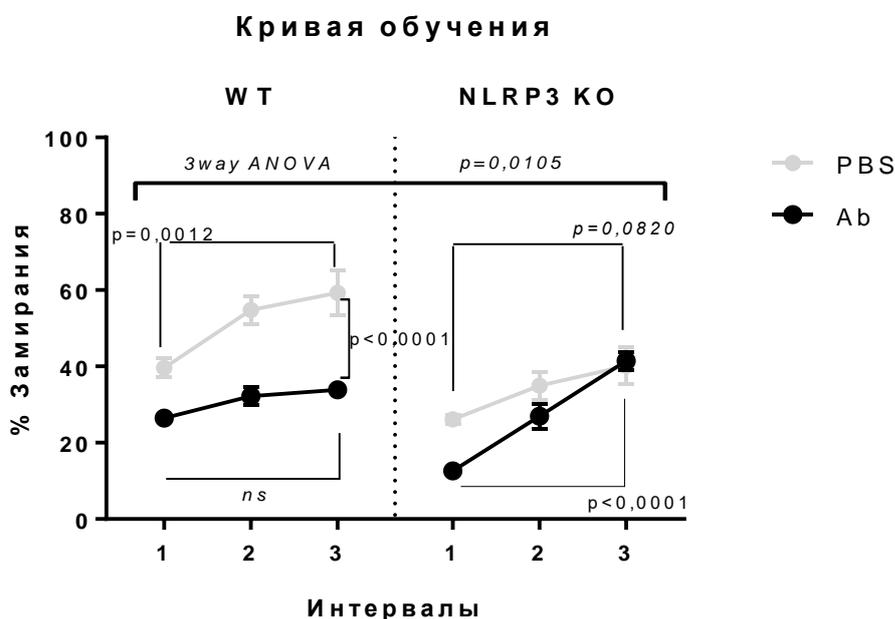


Рисунок 119 – Кривая обучения в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*, ns – незначимо. Ab – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

Во второй день тестирования при анализе извлечения памяти в контексте (контекстуальная память) путем фиксации времени замирания в

новом контексте сравнивали время замирания между четырех групп (C57Bl/6+PBS, C57Bl/6+A β , *Nlrp3*^{-/-}+PBS, *Nlrp3*^{-/-}+A β). Выявили статистически значимые различия ($p=0,0062$, критерий Краскелла-Уоллиса). При попарном сравнении групп между собой статистически значимые различия были в группах C57Bl/6+PBS (67,71 \pm 2,52 %) и C57Bl/6+A β (35,91 \pm 3,21 %) ($p=0,0202$, критерий Dunn's), а также между группами C57Bl/6+PBS (67,71 \pm 2,52 %) и *Nlrp3*^{-/-}+PBS (34,72 \pm 7,99 %) ($p=0,01$, критерий Dunn's). Таким образом, выявлено, что время замирания было снижено у животных дикого типа с моделированием БА, что связано с отсутствием распознаванием среды как потенциально опасного места, а, следовательно, нарушенным процессом извлечения памяти в специфическом контексте. У групп *Nlrp3*^{-/-} время замирания с разными операциями время замирания не отличалось, что, вероятно, свидетельствует об отсутствии влияния действия олигомеров бета-амилоида на контекстуальную память (Рисунок 120).

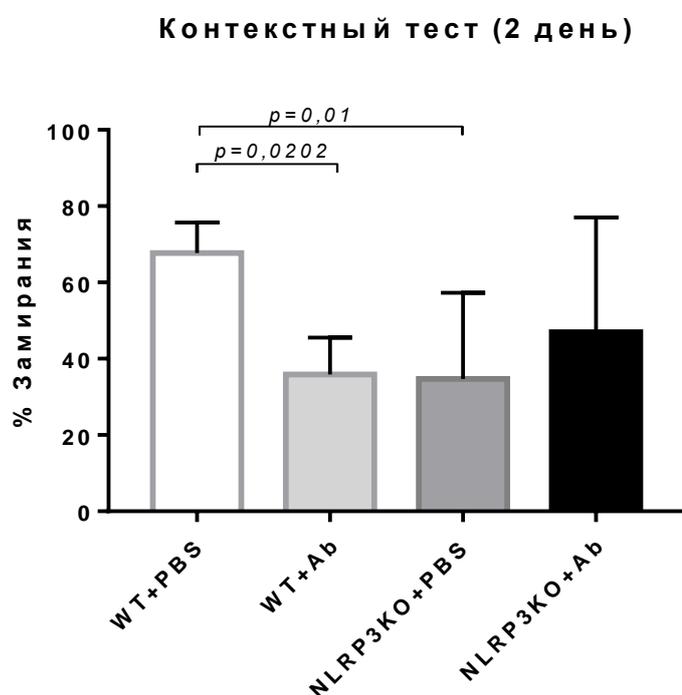


Рисунок 120 – Процент замирания во второй контекстный день. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*. A β – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

В третий сигнальный день тестирования при извлечении памяти в условиях новой среды при сравнении этих же групп между собой выявили статистически достоверные различия: $p=0,001$, критерий Краскелла-Уоллиса. При попарном сравнении групп между собой статистически значимые различия были в группах C57Bl/6+PBS ($73,09\pm 1,92\%$) и C57Bl/6+A β ($45,26\pm 4,3\%$) ($p=0,0005$, критерий Dunn's), а также между группами C57Bl/6+PBS ($73,09\pm 1,92\%$) и *Nlrp3*^{-/-}+PBS ($45,26\pm 4,3\%$) ($p=0,0005$, критерий Dunn's). Аналогично наблюдениям второго дня, зафиксировали, что время замирания было снижено у животных дикого типа с введением олигомеров бета-амилоида из-за отсутствия формирования условного рефлекса страха после подачи белого шума в новой среде. У групп *Nlrp3*^{-/-} время замирания с разными операциями время замирания также как и во второй контекстуальный день не отличалось, может говорить об отсутствии влияния действия олигомеров бета-амилоида на сигнальную память (Рисунок 121).

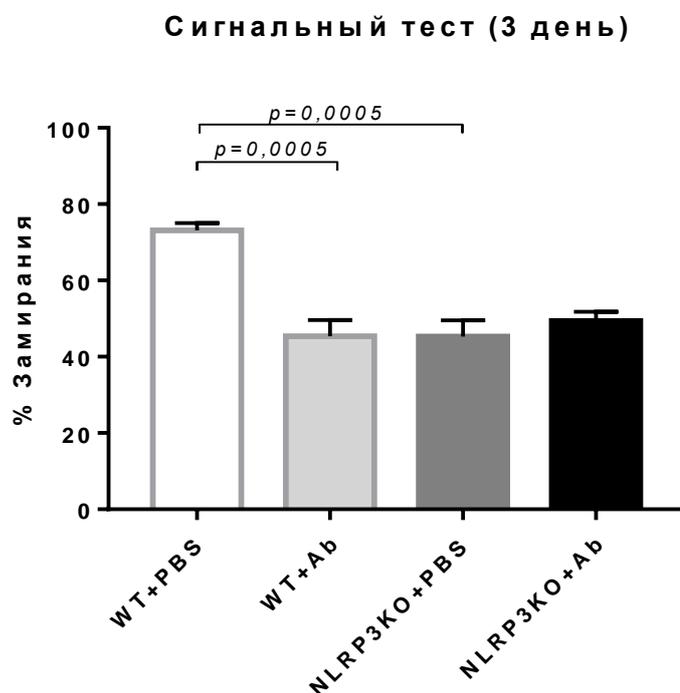


Рисунок 121 – Процент замирания в третий сигнальный день. NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*. A β – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

3.10.8. Влияние делеции гена *CSE* на когнитивные функции и тревожность

3.10.8.1. Поведенческая оценка общей и исследовательской активности и тревожности у мышей нокаутных по гену *CSE* (*CSE*^{-/-})

Мышей с делецией гена *CSE* тестировали в тесте «Открытое поле» для оценки общей локомоторной активности, исследовательской активности и тревожности [353]. В качестве контроля использовали мышей с генетическим фоном C57Bl6. Исследования выполнены на базе Немецкого института исследования питания человека (German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke (DIfE)), Потсдам, Германия.

Эксперименты были выполнены в три сессии: пребывание в течение 10 минут в открытом поле, 10-минутная сессия с помещением в центр неживого объекта, 10-минутная сессия с помещением в центр живого/социального объекта (другой особи) [255].

В каждой сессии оценивали: дистанцию, пройденную в открытом поле; время в центральной части открытого поля, число входов в центр, а также дистанцию в центральной части. В сессиях с объектами оценивали также число подходов и время, проведенное с несоциальным/социальным объектом.

В первой сессии при помещении мыши в открытое поле выявили, что пройденная дистанция у *CSE*^{-/-} мышей была ниже ($45,96 \pm 3,38$ м) по сравнению с мышами дикого типа ($61,66 \pm 3,22$ м) ($p=0,0037$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 122). Число входов в центральную часть открытого поля у *CSE*^{-/-} мышей статистически значимо меньше ($22,63 \pm 2,05$) в сравнении с контрольными мышами дикого типа ($32,5 \pm 3,21$) ($p=0,0196$, критерий Манна-Уитни), тем не менее не выявили статистически значимых отличий во времени нахождения в центральной части у *CSE*^{-/-} мышей ($85,11 \pm 11,74$ с) и у мышей контроля ($88,09 \pm 8,8$) ($p=0,8785$, критерий Манна-Уитни). Дистанция, пройденная в центральной части открытого поля мышами с делецией гена

CSE, была статистически значимо меньше ($7,18 \pm 0,85$ м) дистанции, пройденной в центре контрольными мышами ($12,46 \pm 1,16$ м) ($p=0,0027$, критерий Манна-Уитни). Поэтому в совокупности, полученные данные при тестировании в первой сессии с целью изучения общей и поисковой активности позволяют заключить о снижении таких видов активности у *CSE*^{-/-} мышей [353].

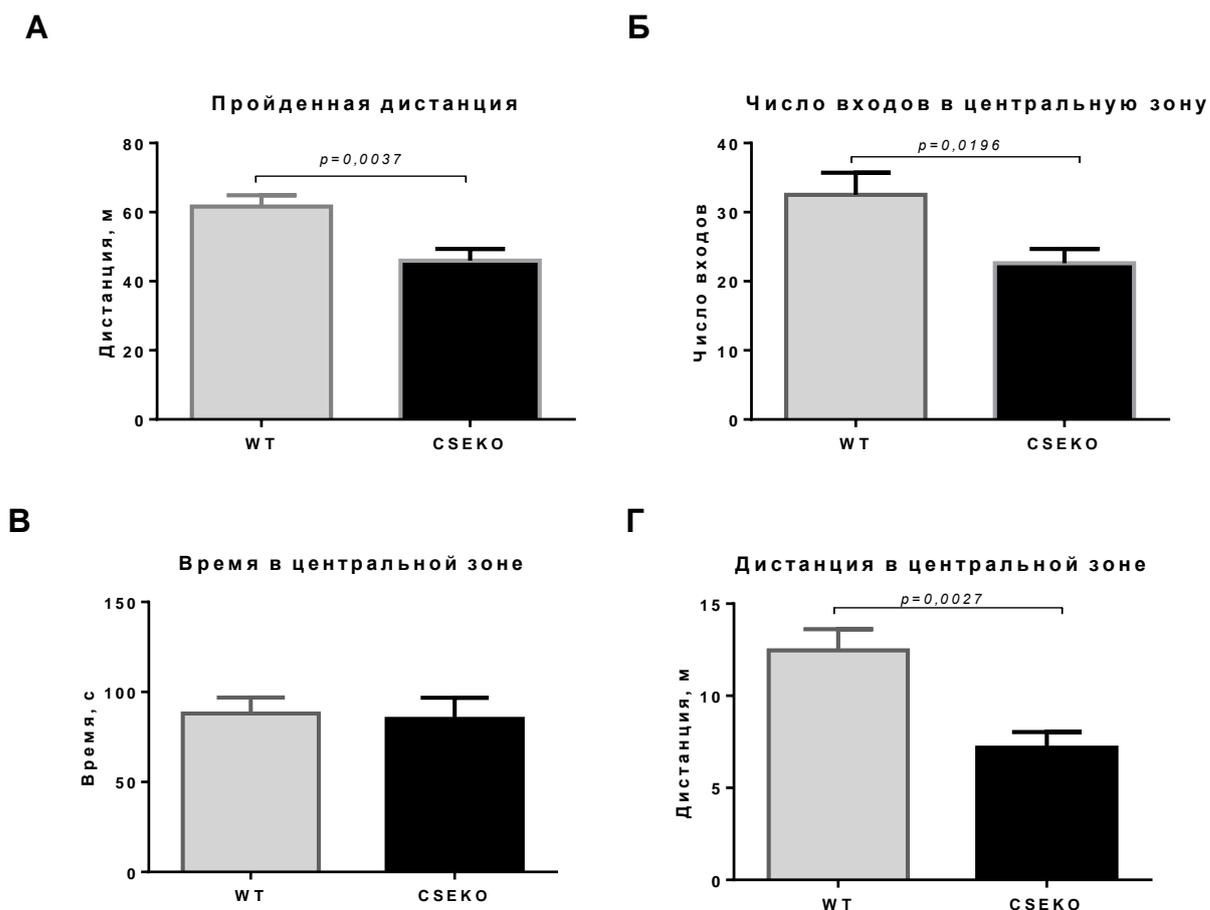


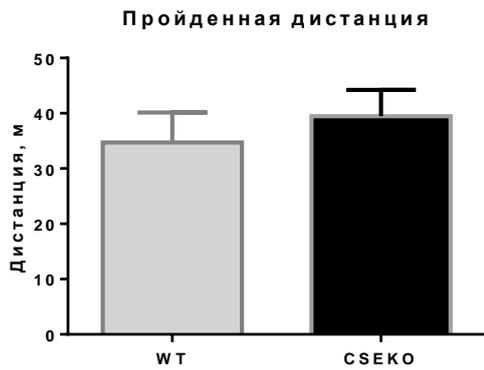
Рисунок 122 – (А-Г) Результаты тестирования в тесте «Открытое поле». Первая 10-минутная сессия. WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*.

Во второй сессии в центр открытого поля поместили неживой объект для продолжения изучения исследовательской активности мышей. Общая дистанция, пройденная в данном тесте, между группами не отличалась: у мышей *CSE*^{-/-} – $39,49 \pm 4,75$ м) в сравнении с мышами дикого типа ($34,73 \pm 5,41$ м) ($p=0,4807$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 123). Число входов в центральную часть также не отличалось у *CSE*^{-/-} мышей ($24,78 \pm 3,3$)

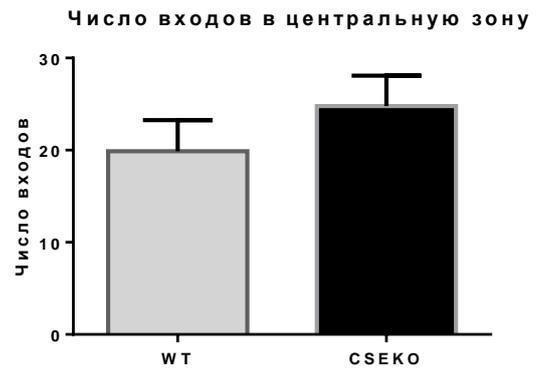
относительно WT мышей ($19,88 \pm 3,88$) ($p=0,2443$, критерий Манна-Уитни). При этом как и в первой сессии время в центральной части не отличалось между группами ($p=0,8048$, критерий Манна-Уитни). Не было статистически значимых различий и в длине дистанции, пройденной $CSE^{-/-}$ мышами по сравнению с контрольной группой – $7,38 \pm 1,53$ м и $8,41 \pm 2,27$ м соответственно ($p=0,8048$, критерий Манна-Уитни), а также ни число подходов, ни время, проведенное с объектом, стоящим в центре, у двух групп не отличалось ($p=0,4874$) и ($p=0,4354$) соответственно. Это говорит о том, что, несмотря на имеющуюся тревожность и беспокойство в открытом пространстве, тем не менее $CSE^{-/-}$ мыши проявляют интерес к несоциальному объекту.

В третьей части эксперимента с предъявлением живого (социального стимула) оценивали те же параметры, что и в предыдущих сессиях. Пройденная дистанция в тесте, снижена у $CSE^{-/-}$ мышей – $20,65 \pm 2,82$ м), в контроле – $33,76 \pm 3,58$ м) ($p=0,0221$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 124). Число входов в центральную часть поля меньше у $CSE^{-/-}$ мышей ($12,0 \pm 2,08$) по сравнению с контрольными мышами ($22,86 \pm 3,23$) ($p=0,0157$, критерий Манна-Уитни). При этом время, проведенное в центральной части, не отличалось между группами ($p=0,6454$, критерий Манна-Уитни), также, как и дистанция, пройденная в центральной части ($p=0,1949$, критерий Манна-Уитни). Также не было выявлено статистически значимых отличий в числе подходов к социальному объекту между группами ($p=0,3737$), но время, проведенное с социальным объектом у группы $CSE^{-/-}$ мышей было статистически значимо меньше ($19,27 \pm 10,39$), чем у контрольных мышей ($115,1 \pm 46,47$) ($p=0,0411$, критерий Манна-Уитни). Полученные результаты при тестировании в третьей сессии позволяют предположить отличия $CSE^{-/-}$ мышей в социальном поведении. Для более точной характеристики фенотипа проведены специальные тесты на социализацию.

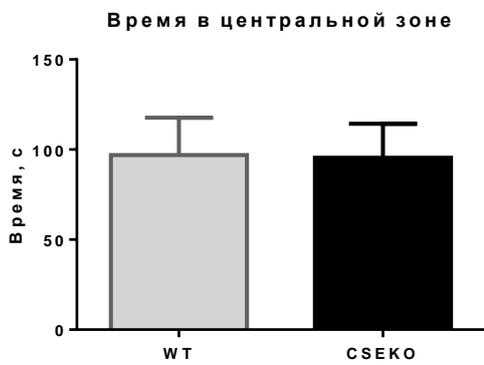
А



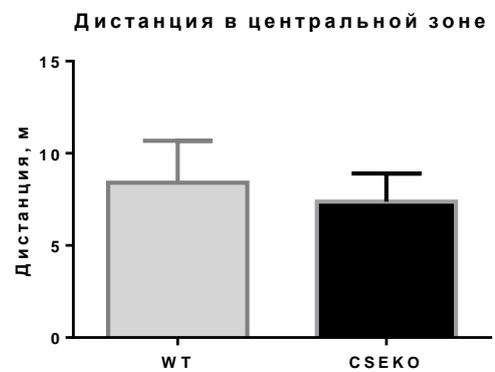
Б



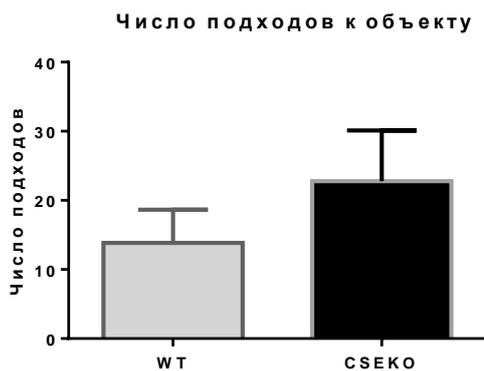
В



Г



Д



Е

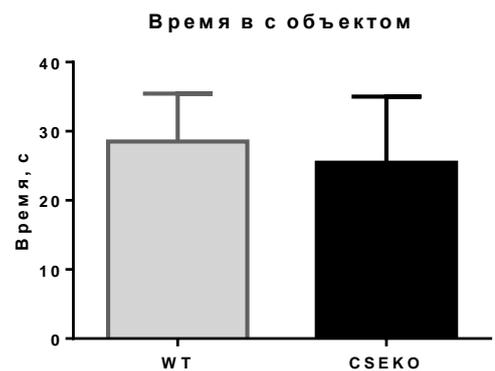
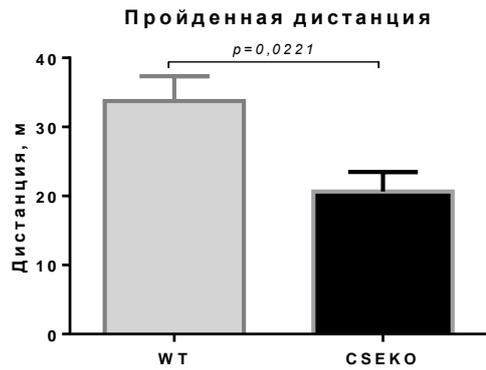
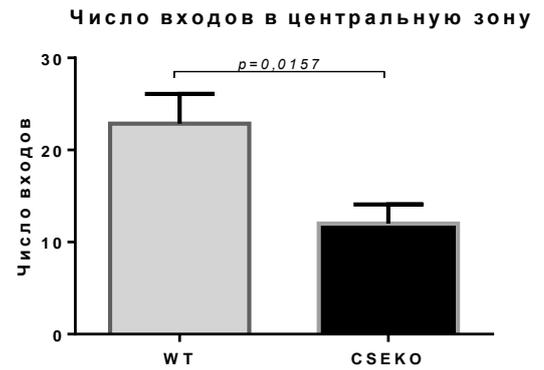


Рисунок 123 – (А-Е) Результаты тестирования в тесте «Открытое поле». Вторая 10-минутная сессия с несоциальным (неживым) объектом. WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*.

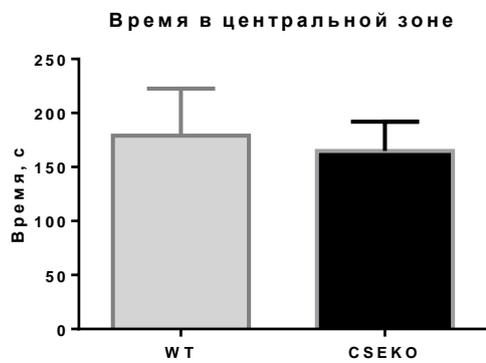
А



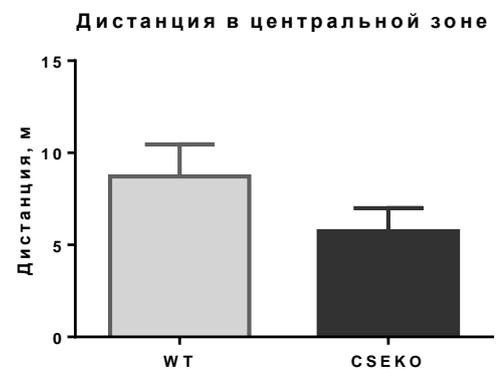
Б



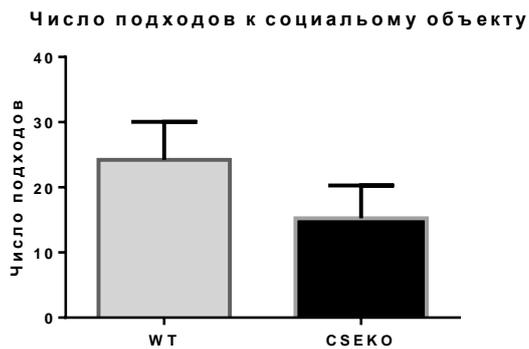
В



Г



Д



Е

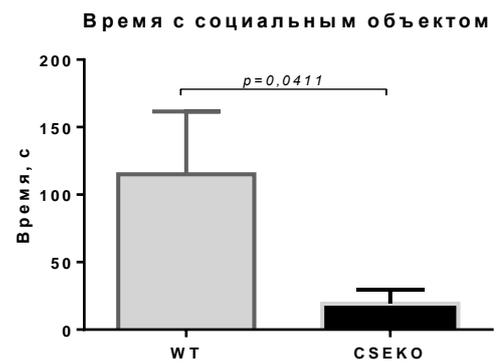


Рисунок 124 – (А-Е) Результаты тестирования в тесте «Открытое поле». Третья 10-минутная сессия с социальным (живым) объектом. WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*.

3.10.8.2. Поведенческая оценка социализации и социальной памяти у мышей нокаутных по гену *CSE* (*CSE*^{-/-})

«Пятипопыточный тест» для исследования социальной памяти оценивает познание, а именно способность распознавать новых и знакомых животных. Также оценивается интерес к животному, подсаживаемому в каждой попытке в течение первый 60 секунд взаимодействия. Таким образом, с помощью данного теста оценивалась социализация и социальная память.

При исследовании социального поведения в данном тесте использовали двухфакторный дисперсионный анализ с изучением влияния факторов: *Генотипа* и «*Попытки*». Оценивали время, проведенное с особью в течение 60 секунд взаимодействия. При сравнении групп между собой выявили статистически значимое влияние генотипа ($F(1,78) = 11,96, p=0,0009$), а также влияние самой попытки ($F(4,78) = 6,928, p<0,0001$). Статистического влияния взаимодействия двух факторов не было выявлено ($F(4,78) = 35,14, p=0,1043$).

При множественном сравнении с использованием критерия Tukey's проанализировали динамику изменений социальных взаимодействий с при четырехкратной последовательной подсадке знакомой особи с последующей подсадкой новой особи. Так не выявили различий при подсадке первой особи (когда она еще является для испытуемой новой) ($p>0,9999$), что говорит о сохранении социального интереса в обеих группах. При последующих подсадках этой же особи к испытуемой происходит постепенное угасание интереса, что свидетельствует о снижении интереса за счет узнавания и привыкания к этому объекту (Рисунок 125). Однако при подсадке новой особи у животных с делецией гена *CSE* нет разницы во времени социального взаимодействия между четвертой попыткой – уже знакомой особью ($21,4\pm 4,75$ с) и пятой (новой) попыткой ($25,98\pm 2,9$ с) ($p=0,9990$). Такой результат показывает неспособность испытуемой особи (*CSE*^{-/-} мышей) отличить старый объект от нового. Вместе с тем в контрольной группе мыши демонстрируют типичное поведение в данном тесте, проявляющееся увеличением времени

социального взаимодействия с новой особью ($50,05 \pm 1,74$ с) при сравнении с уже знакомой ($28,07 \pm 6,5$ с) ($p=0,0272$). Также статистически значимые различия наблюдались при сравнении времени контакта с новой особью (пятой попыткой) у мышей контроля и $CSE^{-/-}$ мышей ($p=0,01$).

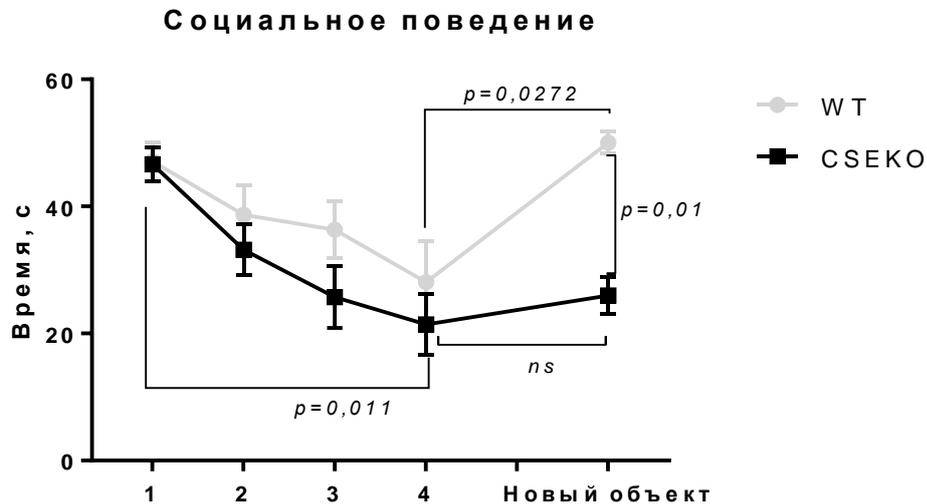


Рисунок 125 – Результаты тестирования в тесте «Социальный пятипопыточный». WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену CSE , ns – незначимо.

Таким образом, проведенный тест показывает, что у мышей с делецией гена CSE не нарушен социальный интерес к животным, однако они не способны дифференцировать знакомый объект от нового.

3.10.8.3. Поведенческая оценка рабочей памяти у мышей нокаутных по гену CSE ($CSE^{-/-}$)

Для исследования определенных изменений рабочей памяти, а также внимания, тревоги, предпочтения новизны широко используется тест «Распознавание нового объекта» [30].

Для количественной оценки в тесте могут быть использованы различные параметры. В данном эксперименте был определен индекс различия (DI), который позволяет различать новые и знакомые объекты. Результат может варьироваться между +1 и -1, где положительное значение указывает на

большее время, проведенное с новым объектом, отрицательное – на большее время, проведенное со знакомым объектом, а нулевое значение указывает на нулевое предпочтение [30].

Со временем были разработаны другие меры оценивания поведения в парадигме «Распознавание нового объекта». Процент времени, потраченного на исследование нового объекта, относительно общего времени, затраченного на исследование обоих объектов, является мерой распознавания нового объекта [294]. Эта концепция может быть представлена индексом распознавания (RI), т. е. временем, потраченным на исследование нового объекта относительно общего времени исследования объектов. Этот показатель является основным показателем способности запоминать [56].

Так в тесте «Распознавание нового объекта» были определены два основных индекса: индекс различий (DI) и индекс распознавания (RI). Индекс различий у мышей с делецией гена *CSE* составил $(-0,15 \pm 0,1)$, что статистически значимо меньше, чем у животных контрольной группы $(0,31 \pm 0,08)$ ($p=0,0087$, критерий Манна-Уитни). Таким образом, отрицательное значение данного индекса у мышей опытной *CSE*^{-/-} группы указывает на большее время, проведенное с уже знакомым объектом. Известно, что новые стимулы могут изменять поведение животных, вызывать стрессовые реакции, вызывать повышение уровня кортикостерона в плазме, что является основным показателем стресса и указывает, что новый объект может вызывать стресс [30] (Рисунок 126).

Как уже было описано, нулевой DI указывает на одинаковое предпочтение двух объектов. Нормальный уровень DI при анализе долговременной и кратковременной памяти варьируются от 0,25 до 0,45, как было получено у животных контрольной группы $(0,31 \pm 0,08)$. Отрицательный же DI (как у *CSE*^{-/-} мышей) может указывать на неофобию (боязнь нового) [30].

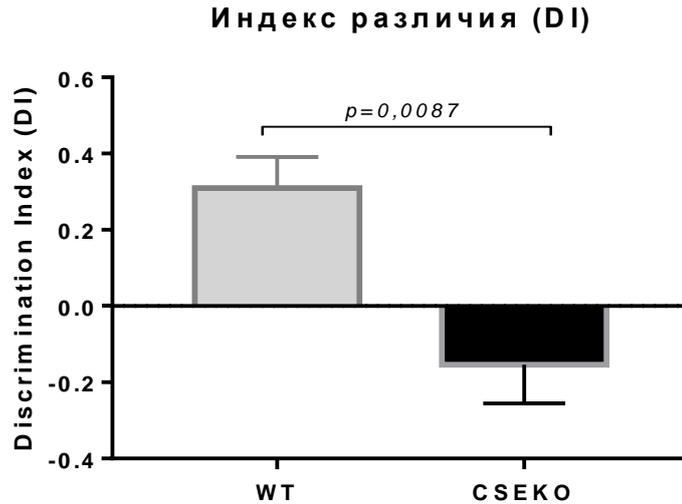


Рисунок 126 – Индекс различия (Discrimination Index, DI). WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*.

При анализе индекса распознавания (RI) отметили, что данный показатель был выше у мышей контроля ($0,6 \pm 0,04$) в сравнении с *CSE*^{-/-} мышами ($0,44 \pm 0,04$) ($p=0,0401$, критерий Манна-Уитни), что характеризует более высокую способность запоминать у мышей контрольной группы, чем у мышей с делецией гена *CSE* (Рисунок 127).

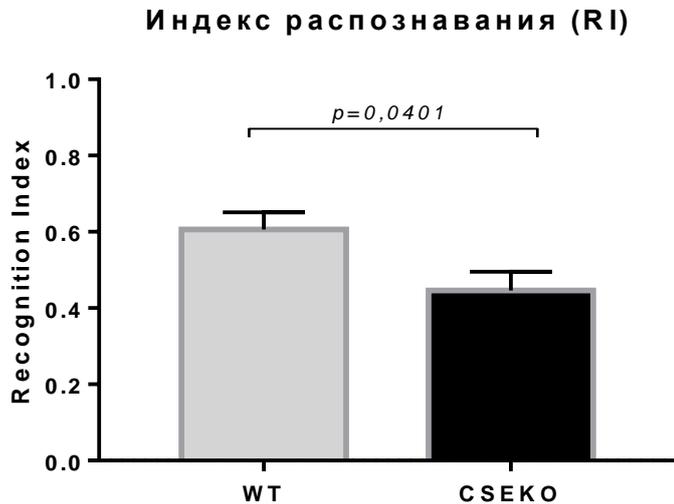


Рисунок 127 – Индекс распознавания (Recognition Index, RI). WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нейрогенез и сложные формы поведения при нейровоспалении, ассоциированом с нейродегенерацией

Нейрональные стволовые клетки и их потомство придают уникальный режим пластичности гиппокампа, который важен для поддержания нормальных функций, таких как гиппокамп-зависимое обучение, память и регуляция настроения, тревожность, социальные взаимодействия, адаптация к непрерывным изменениям среды [207].

НСК в субгранулярной зоне – это мультипотентные клетки, которые находятся либо в состоянии покоя, либо в активном состоянии, и они не обладают заранее определенными программами для генерации конкретного типа нейрональных клеток. Вместо этого они находятся в тесном контакте с кровеносными сосудами и имеют рецепторы для множества мембраносвязанных факторов, а также растворимых факторов, выделяемых нейрогенной нишей, которые позволяют им ощущать микроокружение и соответственно изменять свое пролиферативное поведение [281]. Когда НСК активны, они способны к самообновлению, но они также могут привести к образованию переходных амплифицирующих прогениторных клеток, которые, в свою очередь, дают начало нейробластам и которые могут в дальнейшем развиваться в зрелые гранулярные нейроны. В качестве альтернативного пути и при физиологических условиях НСК также могут привести к образованию астроцитов [52].

В физиологических условиях НСК обеспечивают образование глутаматергических нейронов, формирующих гранулярный слой, в более высоком соотношении, чем астроцитов, на протяжении всей жизни [51].

В пронеурогенных условиях, таких как когнитивная стимуляция, сигнальные молекулы, как например сероводород, продуцируемый эндотелиоцитами (CSE), физиологические уровни RAGE и NLRP3-

инфламмасом, активируются, модулируя деятельность стволовых клеток таким образом, что преобладают пролиферативные процессы нейрогенеза. При патологических состояниях таких как нейровоспаление, ассоциированное с нейродегенерацией, происходит активация глии и высвобождение провоспалительных цитокинов $IL1\beta$, HMGB, супрафизиологические уровни NLRP3 инфламмасом и продуктов RAGE увеличиваются, что, в свою очередь, ведет к образованию из НСК преимущественно астроцитов и способствует снижению пролиферации нейрональных клеток-предшественников [313].

Многочлеточная нейрогенная ниша регулирует комплекс последовательной активации, пролиферации и дифференцировки клеток. В нейрогенную СГЗ нишу входят сами НСК, их непосредственное потомство, гранулярные нейроны, интернейроны, эндотелиальные клетки, астроциты и микроглия. Эти множественные типы клеток способствуют передаче сигналов в пределах нейрогенной ниши, которая поддерживает этот нейрогенный процесс контролируемым образом, а также во время когнитивной стимуляции и при нейровоспалении. В СГЗ локальные астроциты играют ключевую роль в нейрогенезе как через межклеточные контакты, так и через высвобождение растворимых факторов. В исследовании было убедительно показано, что базальный уровень NLRP3 инфламмасом способствует нейрональной дифференцировке в здоровом головном мозге [313].

Внешние факторы реконструируют клеточную и молекулярную нишу и ее компоненты, которые, в свою очередь, модифицируют пролиферативное поведение клеток-предшественников нервной системы. Теперь ясно, что молекулярные сигналы являются ключевыми факторами в судьбе клетки, учитывая, что они запускают экспрессию генов. Молекулярный профиль может варьироваться в пределах той же самой ниши и различные типы внешних факторов динамически модулируют нейрогенез гиппокампа у взрослых либо с негативным или положительным эффектами при нейровоспалении и когнитивной стимуляции, соответственно [313].

Следует отметить, что в физиологических условиях продукция цитокинов находится в равновесии и постоянная продукция этих молекул необходима для поддержания надлежащего развития, физиологии и гомеостатической функции ЦНС. Аналогично и в данном исследовании была показана роль NLRP3 инфламмасом в процессах запоминания в здоровом мозге. Так NLRP3 играют роль в направленной миграции клеток из субгранулярного слоя в гранулярный, участвуя тем самым в консолидации памяти.

4.1. Особенности нейрогенеза и субпопуляций астроцитов в нейрогенной нише головного мозга в норме и при нейродегенерации: роль когнитивной стимуляции. Экспрессия NLRP3 инфламмасом на разных этапах нейрогенеза

Болезнь Альцгеймера является одной из наиболее распространенных форм деменции. С момента начала изучения БА понимание возникновения и развития заболевания вращалось вокруг амилоидных β (A β) пептидов [156]. Пептиды A β образуются путем последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP) и могут существовать в нескольких формах, таких как мономеры, олигомеры, протофибриллы и фибриллы [19]. Хотя о болезни известно много, самые ранние триггеры и патогенез БА до сих пор полностью не изучены [419]. Гипотеза амилоидного каскада до сих пор остается одной из ведущих теорий инициации и прогрессирования БА. Эта гипотеза утверждает, что пептиды A β и нерастворимые бляшки инициируют каскад патологических событий, приводящих к aberrантному фосфорилированию тау, потере нейронов и возможной деменции [161]. Действительно, A β бляшки и нейрофибриллярные тау-клубки до сих пор считаются золотым стандартом с точки зрения подтверждения посмертной болезни. Хотя имеющиеся в литературе данные подтверждают гипотезу об

амилоидном каскаде, она не полностью объясняет прогрессирование заболевания [419].

Более поздние данные показали, что амилоидные бляшки не могут быть первичным инициатором патогенеза БА, в основном из-за плохой корреляции между наличием и количеством амилоидных бляшек и серьезностью когнитивных нарушений [397].

Все больше доказательств подтверждают роль олигомерной формы пептида А β (А β) как критического инициатора токсичности в патогенезе БА. Было показано, что олигомеры А β является более нейротоксичным, чем фибриллы А β , которые образуют бляшки. В отличие от амилоидных бляшек, олигомеры А β у людей, как было показано, хорошо коррелируют с серьезностью заболевания, синаптическими изменениями и прогрессированием нейродегенерации. В клиническом исследовании олигомеров А β в коре головного мозга пациентов с БА было примерно в 12 раз выше, чем у их контрольных групп соответствующего возраста [144]. В другом исследовании олигомеры бета-амилоида, введенные в мозг крысы приводили к нарушенной синаптической пластичности и нарушению обучения, как показано в тесте на кондиционирование пассивного избегания [357]. Все эти клинические данные свидетельствуют о том, что олигомеры А β играют критическую роль в патогенезе БА [419].

Эти исследования дали некоторое представление о влиянии олигомеров А β , однако наше понимание роли олигомеров А β *in vivo* является неполным и требует дальнейшего изучения [419].

Чтобы исследовать эффекты олигомеров А β *in vivo*, синтетические олигомеры А β ₁₋₄₂ были введены в дорсальный гиппокамп мозга крысы. Хотя синтетические олигомеры А β могут быть менее сильнодействующими, чем секретируемые клетками, исследования показали аналогичные нейротоксические эффекты [325]. Кроме того, синтетические олигомеры А β доступны и могут быть приготовлены в лаборатории в соответствии с установленными, воспроизводимыми протоколами [419]. В данном

исследовании оценили изменения в пространственном обучении и памяти, используя парадигму водного лабиринта Морриса, а также исследовательское и тревожное поведение, используя приподнятый крестообразный лабиринт. Также был проведен последующий анализ этапов нейрогенеза и экспрессии инфламмасом NLRP3.

Насколько известно, это первое исследование *in vivo*, в ходе которого была проведена однократная инъекция олигомеров А β в гиппокамп и оценка ранних этапов нейрогенеза и поведения.

Кроме того, следует особо отметить, что ранее в исследовании было показано, что через 7 дней после инъекции любое отложение А β , вероятно, было очищено в паренхиме головного мозга, однако, те изменения, которые такая инъекция вызывает, сохраняются [419].

Умеренный дефицит пространственной памяти и нарушение тревожного поведения у крыс, инъецированных олигомерами А β

Результаты предыдущих исследований, полученные при изучении головного мозга пациентов, страдающих БА, показали, что амилоидные бляшки не обязательно предшествуют возникновению когнитивных нарушений [28]. Напротив, выраженные амилоидные отложения наблюдались у людей без когнитивного дефицита [398]. Эти наблюдения показывают, что сенильные бляшки не всегда клинически коррелируют с БА. Учитывая это, было высказано предположение, что мелкие растворимые олигомерные виды А β (олигомеры А β (1–42)), а не амилоидные бляшки, могут быть нейротоксичными и ответственными за синаптические и нейрональные дисфункции, приводящие к физиопатологическим последствиям при БА [40]. Следовательно, связывание растворимых олигомеров А β с клеточными мембранами может вызывать множественные эффекты, влияющие на различные пути, постепенно приводящие к когнитивным проявлениям и расстройствам [282]. Для дальнейшего изучения синаптотоксичности малых изомеров в экспериментальных подходах были рассмотрены поведенческие последствия, вызванные внутримозговыми инъекциями А β .

В настоящее время сохраняются противоречивые результаты, которые, по-видимому, зависят от места инъекции и природы пептида [115]. Исходя из данных литературы, только несколько исследований оценивали влияние прямой инфузии олигомеров А β 1–42 в дорсальный гиппокамп на процессы памяти. Однако недавние результаты показали, что инфузия олигомеров А β 1–42 в гиппокамп влияла на рабочую память, когда память оценивалась только через 10 минут после инъекции, что позволяет предположить, что такой дефицит может быть связан с острым нейротоксическим действием пептида [308]. Напротив, отсроченное влияние олигомерных форм А β , вводимых интрагиппокампажно на рабочую память, которая сильно страдает на ранних стадиях БА, остается слабо охарактеризованным [115].

Еще одно исследование продемонстрировало, что повторные билатеральные инъекции (1 инъекция / в день в течение 4 последовательных дней) олигомерных форм А β 1–42 в дорсальный гиппокамп приводят к длительным нарушениям рабочей памяти, причем этот дефицит наблюдается через 7 дней после последней инъекции, в то время как пространственная память остается неизменной [115].

Тем не менее, остаются противоречивые данные о роли однократной инъекции олигомеров бета-амилоида 1-42 в дорсальный гиппокамп на формирование пространственной памяти и способности к обучению.

В целом ввиду ограниченности экспериментов, в которых изучался потенциальный длительный эффект растворимых олигомеров А β , одной из задач данного исследования было изучение долгосрочного воздействия инъекций А β 1–42 в гиппокамп на мнемонические и молекулярные процессы.

В данной серии экспериментов мы проанализировали последствия инъекций олигомеров А β 1–42 в СА1 зону дорсального гиппокампа (dCA1) для формирования долговременной пространственной памяти. Затем мы изучили влияние инъекций dCA1 А β 1–42 на эффективность пространственной тренировки и на особенности нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга.

Для изучения влияния действия растворимых олигомеров на пространственную память использовали тест водный лабиринт Морриса, который подразумевает под собой последовательные попытки поиска скрытой платформы в течение нескольких дней. Кроме того, данный тест может быть использован в качестве средства для когнитивной пространственной стимуляции (тренинга) [431, 437].

Тестирование в водном лабиринте Морриса использовалось для определения того, приведет ли воздействие олигомеров A β 1-42, инъецированных в гиппокамп крыс, к дефициту пространственного обучения и памяти. На этапе пространственного обучения крысы, инъецированные A β и контрольные (PBS-инъецированные), смогли успешно узнать местоположение скрытой платформы, однако крысы, инъецированные A β 1-42, показали меньшую скорость, о чем свидетельствует более длительное латентное время входа в искомый квадрат, снижение времени пребывания в искомом квадрате, а также число пересечений платформы по сравнению с контрольными крысами

В ходе эксперимента были установлены нарушения пространственной памяти, индуцированные введением олигомеров бета-амилоида. А именно, у крыс с моделированием болезни Альцгеймера не происходит увеличения времени нахождения в квадрате со скрытой платформой с течением времени, т.е. с увеличением тренировочных дней, в ходе которых происходит запоминание расположения платформы относительно дистальных ориентиров. Также число пересечений искомого квадрата со скрытой платформой у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера было ниже относительно крыс без введения бета-олигомеров. Таким образом, введение растворимых олигомеров в дорсальный гиппокамп приводит к нарушению пространственной памяти. Тем не менее определено снижение латентного времени достижения квадрата с платформой в группе крыс с проведением моделирования болезни Альцгеймера в первый и последний дни тренировки. Считается, что латентное время является одной из первых мер,

используемых для количественной оценки поведения в водном лабиринте Морриса, которая отражает время от старта до достижения цели. Однако, несмотря на информативность, эта мера может варьироваться по причинам, не связанным с обучающей способностью животного. Например, разная скорость плавания может привести к различным задержкам, даже если выбранный путь одинаков. Чтобы контролировать эту возможность, были использованы и другие параметры (число входов в квадрат, время в квадрате, оценивались треки движения). Чаще эта мера отражает все же больше стратегии навигации, чем наличие знаний о месторасположении платформы [132, 401].

В связи с этим справедливо говорить все же о наличии нарушений пространственной памяти в группе с введением олигомеров бета-амилоида, но сохраняющейся возможности выбора стратегии для поиска платформы. Следует отметить и характер траектории, характеризующейся склонностью к тигмотаксису (движению ближе к бортам бассейна), которое в норме присуще только поиску платформы в первые дни тренировки [132].

Как уже было упомянуто, выполнение водного лабиринта Морриса в течение 5 последовательных дней может быть использовано не только для оценки пространственной памяти, но и когнитивной стимуляции, т.н. пространственной тренировки [437].

В ходе данной части эксперимента выявлено, что у ложно-оперированных животных (неповрежденный бета-олигомерами мозг) происходит увеличение времени нахождения в искомом квадрате после 5 тренировочных дней по сравнению с крысами, которые не получили такого когнитивного тренинга, что свидетельствует о приобретении знаний о расположении платформы (т.е. активном запоминании). Сравнение крыс с введением олигомеров A β 1-42 после тренировки в ВЛМ с группой без обучения (без предшествующих дней тренировки в ВЛМ) выявило снижение времени латентного входа в искомый квадрат, что также говорит о сохраняющейся способности выбора стратегии поиска скрытой платформы.

То есть можно заключить, что на обе группы влияет пространственная тренировка. Предыдущие исследования также показали, что когнитивно-стимулирующая деятельность связана со снижением риска возникновения деменции [420] и возникновения амнестических умеренных когнитивных нарушений. Такие исследования убедительно показали, что когнитивная стимуляция может уменьшить дефицит памяти при БА. Одно доклиническое исследование также продемонстрировало, что пространственное обучение в водном лабиринте Морриса может уменьшить отложения бета-амилоида, а также гиперфосфорилирование тау-белка и улучшение показателей памяти у мышей 3xTg-AD [327].

Еще одно исследование, выполненное на 3xTg-AD мышах со строгой тренировочной программой, начиная с 3-месячного возраста, которая состояла из повторного обучения в водном лабиринте Морриса через каждые 3 месяца, заканчивающиеся в 18 месяцев, также продемонстрировало, что периодическое когнитивное стимулирование с течением времени может улучшить формирование памяти. Кроме того, в данном исследовании положительную динамику заметили еще в начале таких тренировочных сессий. Эти данные свидетельствуют о том, что ранняя повторная когнитивная стимуляция может способствовать смягчению когнитивного дефицита, наблюдаемого при болезни Альцгеймера.

Кроме того, существуют исследования, показывающие, что несмотря на когнитивный тренинг не наблюдается улучшений в выполнении задания в ВЛМ. Многие авторы полагают, что когнитивная нагрузка может привести к результатам только в случае деменций неальцгеймеровского типа, то есть без отложения амилоидных бляшек.

Продemonстрированное в данном эксперименте положительное влияние пространственной тренировки, возможно, также ассоциировано с тем, что в моделируемой патологии не наблюдается отложения амилоидных бляшек, что соответствует ранним нарушениям при БА. Тем не менее характерная траектория движения крыс с инъекцией олигомеров Аβ в бассейне

(тигмотаксис) также может являться проявлением ранних изменений в поведении животных. Тигмотаксис является широко распространенным поведенческим паттерном, который, как считается, связан с тревогой или страхом [173]. Такое поведение связано с длительным латентным временем первого входа, наблюдаемого в первый день тестирования, следовательно, логично было оценить также как тревожность у данных групп.

Тревожное поведение крыс после инъекции олигомеров Аβ
Изучение нейрогенеза крыс после инъекции олигомеров Аβ после
пространственного обучения крыс

Пространственное обучение в водном лабиринте Морриса влияет на образование и дальнейшую судьбу образованных клеток. Ранее было описано, что у здоровых крыс обучение вызывало увеличение выживаемости новообразованных нейронов в зубчатой извилине гиппокампа [149]. Тем не менее, сообщалось, что регулирование клеток гиппокампа пространственным обучением зависят от типа задачи [243], качества обучения, трудности задачи и / или возраста клеток во время воздействия [107]. У пожилых крыс пространственное обучение в водном лабиринте способствует выживанию относительно зрелых нейронов, апоптозу незрелых клеток и, наконец, пролиферации нейрональных предшественников [101]. Подобные исследования показывают, что пространственное обучение регулирует взрослый нейрогенез сложными способами.

Взрослый нейрогенез у здоровых животных вносит вклад в формирование памяти, особенно пространственной; однако влияние пространственной тренировки на нейрогенез, например, распространение, выживание, апоптоз, миграцию и дифференциацию клеток в зубчатой извилине гиппокампа при нейродегенерации альцгеймеровского типа остается неизученным [438].

Аβ олигомеры в настоящее время рассматриваются как повреждающий фактор для нейронов, приводящий к деменции альцгеймеровского типа [110]. Исследования с использованием пептида человека Аβ1-42 показали

нарушения когнитивных функций на ранней стадии (2-10 дней) после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции. В период между 1 и 29 днями после однократной A β 1-42 инъекции, мыши демонстрировали нарушения в тесте пассивного избегания и пространственного обучения наряду со снижением уровня ацетилхолина в коре и увеличением иммунореактивности маркера астроцитов GFAP и интерлейкина-1 β в гиппокампе [425]. Ранее мы также продемонстрировали, что в головном мозге мышей происходят ранние изменения в нейрогенезе, индуцированные растворимыми формами бета-олигомеров амилоида.

В настоящем же исследовании оценили влияние пространственной тренировки в водном лабиринте Морриса на нейрогенез при БА, вызванной инъекцией A β 1-42 в гиппокамп крыс. Было обнаружено, что пространственное обучение увеличивает количество стволовых клеток в нейрогенной нише головного мозга, а также способствует дифференцировке клеток по нейрональному пути.

Поскольку в настоящее время все еще остаются противоречивые сообщения о нейрогенезе в патологическом головном мозге, исследования, связанные с изучением особенностей такого взрослого нейрогенеза требуют более тщательного подхода. Кроме того, слабо изученной областью остается связь между нейрогенезом и пространственной тренировкой. В литературе имеются единичные упоминания о влиянии пространственного тренинга на нейрогенез и эти исследования были сосредоточены на выживаемости клеток после инъекции бета-амилоида и тренировки животных [439]. Так ранее было показано, что у крыс после инъекции A β 1-42 пространственное обучение способствовало краткосрочному выживанию вновь-образованных клеток, усилению пролиферации, но не влияло на миграцию клеток и ухудшало долгосрочную выживаемость клеток.

Данные, полученные в ходе данного исследования демонстрируют влияние пространственного обучения на ранние этапы нейрогенеза, а также нейрональной дифференцировки. Так нами было показано, что

пространственная тренировка приводит к интенсификации ранних этапов нейрогенеза, а именно усилению экспрессии маркера стволовых клеток в зубчатой извилине гиппокампа у крыс после моделирования болезни Альцгеймера.

Взрослый нейрогенез в зубчатой извилине представляет собой сложный многоступенчатый процесс, который начинается с деления и распространения нейрональных предшественников, находящихся в субгранулярном слое. Согласно полученным данным у крыс после инъекции A β 1-42 пространственное обучение увеличило количество CD133+ клеток в субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа. Затем мы исследовали следующий этап – этап базальных прогениторных клеток, где не было обнаружено различий между группами с тренировкой и без нее.

Однако следует особо подчеркнуть, что, несмотря на увеличение числа маркера стволовых клеток после когнитивной тренировки в группе после инъекции олигомеров амилоида, пролиферация таких клеток не изменяется в отличие от здорового мозга, где происходит увеличение именно активированных стволовых клеток. Таким образом, можно сказать, что после тренировки в ВЛМ у группы после инъекции бета-олигомеров происходит увеличение т.н. «молчащих стволовых клеток», но не активированных. Известно, что НСК во взрослом мозге могут переходить между состоянием покоя и активным, выходя из клеточного цикла и входя в него, соответственно. Состояние покоя стволовых клеток определяется как неделящееся состояние клеток, несущих потенциал клеток-предшественников. Часто соответствующее состоянию G 0 , характеризуется отсутствием экспрессии маркеров пролиферации, часто его называют непролиферирующее, но тем не менее компетентное для пролиферации клеточное состояние [387].

После активации НСК выбирают между различными режимами деления. В ходе асимметричного деления клетка самообновляется и дает таким образом стволовую клетку и клетку-предшественник, в то время как симметричное деление дает либо две НСК (самообновляющиеся), либо две клетки-

предшественницы (не самообновляющиеся). Клетки-предшественницы (прогениторные) могут дифференцироваться только в определенный тип клеток, или они могут быть мультипотентными и должны сделать выбор клеточной судьбы до дифференциации [53]. В ходе исследования выявлено, что увеличенное число молчащих стволовых клеток в группе после инъекции олигомеров бета-амилоида не приводит к изменению базальных прогениторных клеток в нейрогенной нише. Но само по себе увеличение пула клеток, обладающих свойствами столовых, может иметь нейропротекторное значение при нейродегенерации.

В здоровом головном мозге (в группе контроля) пространственная тренировка приводит к увеличению именно активированных НСК, которые способны активно делиться, обеспечивая эффективный нейрогенез во взрослом головном мозге.

Известно, что при старении активированные НСК теряют пролиферативный потенциал и становятся молчащими, но, что примечательно, они могут в определенной степени реактивироваться при стимуляции, например, после физических упражнений, что указывает на то, что пластичность НСК сохраняется в определенной степени в пожилом организме [202].

Также в ходе данного исследования было показано, что обучение в водном лабиринте Морриса побудило клетки дифференцироваться по нейрональному пути, что сопровождалось увеличением маркера нейробластов и сокращением количества GFAP-иммунопозитивных астроцитов. Полученные данные не согласуются с полученными ранее об отсутствии влияния тренировки на мигрирующие нейробласты и увеличение количества астроцитов [439].

Таким образом, обучение частично восстанавливает начальные этапы нейрогенеза, увеличивая резерв стволовых клеток и, увеличивая количество нейробластов, может способствовать миграции клеток-предшественников из субгранулярного слоя в гранулярный слой. Увеличение количества CD133-

иммунопозитивных клеток в нейрогенных нишах маркирует увеличение резервного пула нейрональных стволовых клеток, но не эндотелиальных прогениторных клеток вследствие интенсификации ангиогенеза, ассоциированной с обучением, поскольку количество астроцитов, экспрессирующих GFAP, уменьшается.

Одной из причин большего количества стволовых клеток по сравнению с базальными прогениторами может быть особенность головного мозга продуцировать больше стволовых клеток, поскольку часть из них будет подвергнута апоптозу. Ранее было показано, что новые генерируемые нейроны при БА в зубчатой извилине не становятся зрелыми нейронами, хотя нейропролиферация увеличивается [245]. В данном исследовании также обнаружено увеличение нейробластов по сравнению с нетренированными крысами после инъекции бета-амилоида. Также зафиксировано увеличение миграции вновь образованных клеток (нейробластов) по ростральному миграционному пути для интеграции данных клеток в нейрональные цепи ольфакторных луковиц.

Результаты современных исследований показали защитное воздействие физических упражнений при БА, вызванные нейродегенеративным и нейровоспалительным процессом. Было показано, что нейропротективное воздействие физических упражнений на гиппокамп, по-видимому, усиливается при экспрессии гена *c-fos* в зубчатой извилине; а кроме того происходит увеличение количества BrdU/DCX-положительных клеток в зубчатой извилине; повышение уровня числа GFAP⁺ астроцитов и уменьшение белка S100beta, повышение целостности гематоэнцефалического барьера; увеличение пролиферации клеток и подавление апоптоза в зубчатой извилине [188].

Тем не менее, в ходе данного исследования получены новые данные о том, что когнитивная нагрузка не влияет на выживаемость клеток и не приводит к увеличению экспрессии гена раннего реагирования *Arc/Arg3.1*,

напротив приводит к снижению числа астроцитов, экспрессирующих GFAP, но вместе с тем подтверждает снижение экспрессии белка S100beta.

У ложно-оперированных крыс пространственное обучение не влияло на количество молчащих стволовых клеток, базальных прогениторных клеток и нейробластов, а также их выживаемость, однако достоверно увеличилось число активно пролиферирующих стволовых клеток и когнитивный тренинг приводил к увеличению экспрессии Arc/Arg3.1 в зубчатой извилине.

Увеличение молчащих стволовых клеток и дифференцировки клеток по нейрональному пути при нейродегенерации может рассматриваться как компенсаторный механизм сниженной выживаемости, соответственно в нормальном головном мозге без нейродегенерации, где этапы нейрогенеза не нарушены, такого эффекта не наблюдается, а имеется лишь увеличение пула резерва пролиферативно компетентных клеток [439].

Экспрессия инфламмасом при обучении

Вместе с тем, нами были выявлены интересные особенности влияния пространственной тренировки на экспрессию NLRP3 инфламмасом. При этом мы показали, что тренировка в водном лабиринте Морриса не приводит к изменению экспрессии инфламмасом в стволовых клетках, базальных прогениторных клетках, а также нейробластах при введении олигомеров бета-амилоида.

Ранее было показано, что зрелые нейроны начинают экспрессировать инфламмасы *in vivo* и *in vitro* в моделях нейровоспаления и нейродегенеративных заболеваний на животных. Так, было продемонстрировано, что при болезни Альцгеймера наблюдалось 25-30-кратное увеличение экспрессии нейронов, колокализирующих инфламмасы [204]. Однако оставался неизученным вопрос характера изменений экспрессии NLRP3 инфламмасом после когнитивного тренинга.

Известно лишь, что у *Nlrp3*-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 [168]. Поэтому логично было бы предположить, что пространственная тренировка может приводить к сокращению экспрессии инфламмасом в головном мозге. Тем не менее, таких наблюдений после инъекции бета-амилоида зафиксировано не было, что может быть связано с недостаточной продолжительностью тренировок, тяжестью поражения головного мозга, а также с выполнением инфламмасомами других, не связанных с развитием нейровоспаления и нейродегенерации, функций. Такие предположения были основаны на полученных результатах в группе ложно-оперированных животных: увеличение экспрессии NLRP3 инфламмасом в стволовых клетках и нейробластах после пространственной тренировки. Подобные наблюдения не были описаны в литературе.

Единственное недавнее исследование показало, что, например, семейство HMGB связано с переходом НСК из состояния покоя в пролиферацию и что старение отрицательно влияло на эти клеточные популяции, в то время как выполнение упражнений стимулировало пролиферацию клеток HMGB+ [212]. Известно, что инфламмасы являются ключевыми регуляторами HMGB1-индуцированного воспаления [155]. Таким образом увеличение NLRP3 инфламмасом в нейрональных стволовых клетках и в нейробластах после когнитивной стимуляции в норме, в то время как при нейродегенерации такого эффекта не наблюдалось, равно как и увеличения числа активированных стволовых клеток, что позволяет рассматривать NLRP3 инфламмасы не только как молекулы, опосредующие воспаление, но и как индукторы активации нейрональных клеток при когнитивной стимуляции.

Известно, что NLRP3 инфламмасы участвуют в созревании провоспалительного интерлейкина 1 β . При этом хроническая гиперэкспрессия IL-1 β в гиппокампе приводит к ухудшению пространственной и ассоциативной памяти [274]. 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 [146] и LTP [329]. Имеются исследования, доказывающие, что данный цитокин 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 [146].

В связи с этим, логично предположить, что увеличение экспрессии NLRP3 инфламмасом в мозге контрольных животных после пространственной тренировки может быть связано с участием данного типа инфламмасом в процессах, активируемых при запоминании и поиске платформы в водном лабиринте Морриса.

Таким образом, в здоровом мозге обучение крыс в ВЛМ сопровождается усилением экспрессии инфламмасом в нейробластах, у животных с экспериментальной БА обучение такого влияния не оказывает. Также недавно была описана роль IL-1 β в миграции нейронов во время развития мозга, что дает основание для понимания роли IL-1 β в головном мозге и может иметь обоснования для профилактики некоторых нарушений нервной системы вследствие ненормальной нейрональной миграции [262].

Поскольку было обнаружено увеличение NLRP3 инфламмасом в нейробластах, клетках, способных мигрировать из субгранулярного слоя в гранулярный, то возможно предположить, что инфламмасомы необходимы для процесса нормальной миграции в здоровом мозге.

Таким образом, в ходе данной части эксперимента впервые обнаружено, что обучение способствует увеличению экспрессии инфламмасом в нейробластах в нейрогенных нишах. С учетом данных о том, что поддержание пула нейробластов и их способность к эффективной мобилизации актуальны для процесса запоминания, весьма вероятно, что пространственный тренинг сопровождается экспрессией инфламмасом в клетках нейрогенных ниш. Нейродегенерация альцгеймеровского типа приводит к нарушению этого механизма.

В совокупности это дает основания предполагать, что опосредованные активностью инфламмасом клеточные сигнальные пути в НСК и нейробластах сопровождают процессы запоминания (Рисунок 128).

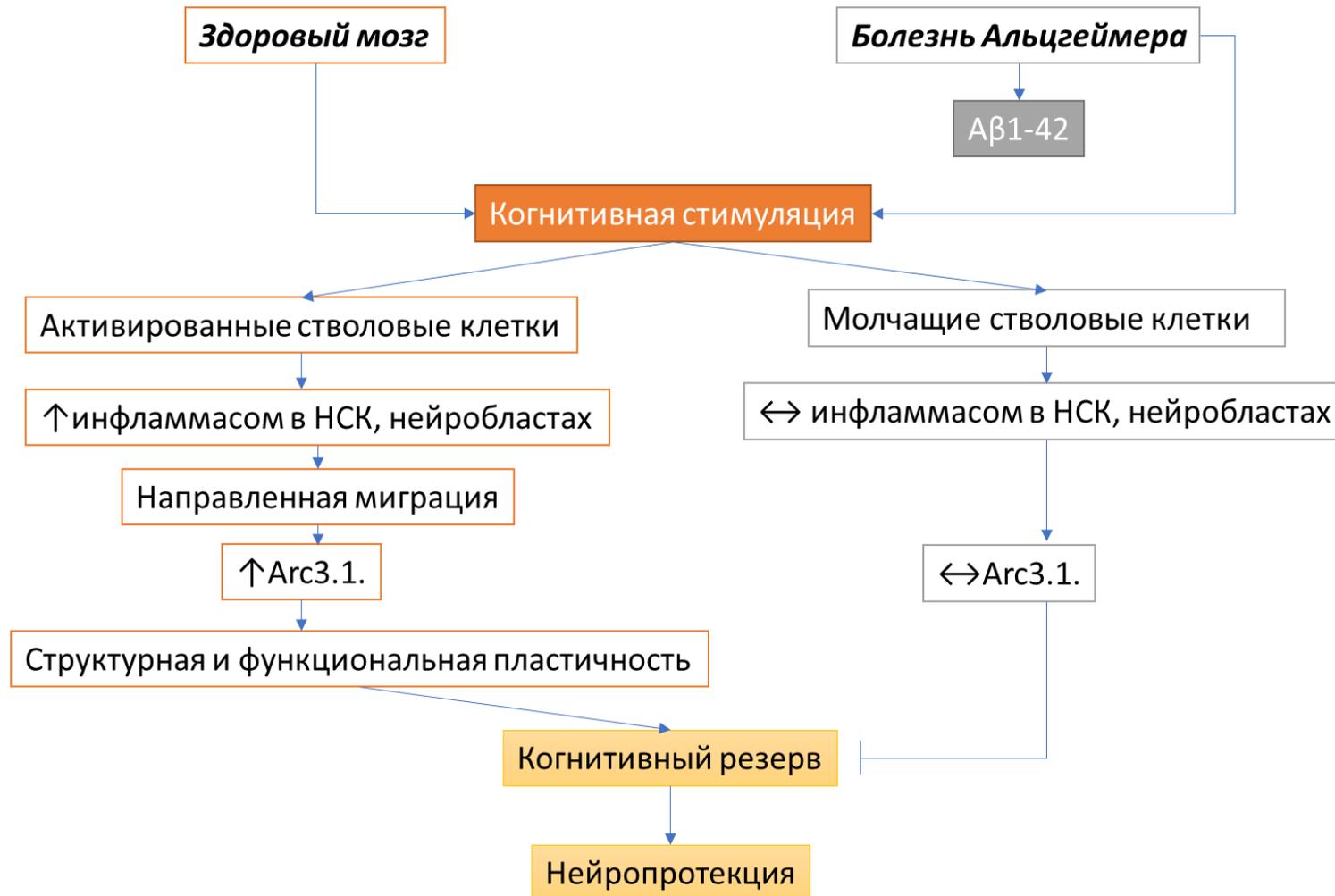


Рисунок 128 – Роль когнитивной стимуляции в функционировании компонентов нейрогенной ниши. НСК – нейрональные стволовые клетки

Экспрессия НАД+конвертирующих ферментов в клетках нейрональной и глиальной природы

Была изучена экспрессия НАД+-конвертирующих ферментов – CD38 и CD157 на клетках нейрональной и глиальной природы в нейрогенных нишах головного мозга, нарушение функционирования которых ассоциировано с развитием хронической нейродегенерации.

В ходе исследования было обнаружено значимое снижение экспрессии молекул CD38 и CD157 в клетках нейрональной природы в нейрогенных нишах головного мозга при нейродегенерации относительно контроля. Однако экспрессия обоих типов молекул значительно увеличивается в клетках астроглиальной природы в зубчатой извилине гиппокампа при нейротоксическом действии A β *in vivo*.

Ранее было показано, что дефицит экспрессии CD38 снижает способность восстановления после травмы головного мозга у мышей, а также, что дефицит CD38 значительно нарушает когнитивные функции после черепно-мозговой травмы, предполагая, что молекула CD38 важна для когнитивных функций и памяти. Таким образом, экспрессия CD38 в гиппокампе играет защитную роль [174]. Вместе с тем имеются ранее опубликованные данные о том, что CD38 был также обнаружен в нейрофибриллярных клубках, которые образуются в околядерной части нейронов и проксимальных дендритах, которые являются отличительной чертой патогенеза болезни Альцгеймера [59].

Также имеются сведения, полученные при изучении роли делеции гена *Cd38* на развитие болезни Альцгеймера. Так было показано, что некоторые проявления болезни Альцгеймера ослабляются на модели мышей с делецией *Cd38*. А именно, в отсутствие экспрессии CD38 у мышей с БА отмечалось значительное снижение числа A β бляшек и уровней растворимых A β олигомеров, что коррелировало с улучшенным пространственным обучением [48].

Известно, что НАД⁺-конвертирующие ферменты вовлечены в регуляцию большого числа функций астроцитов: регуляция ответа клеток на действие нейротрансмиттеров, регуляция процессов нейрогенеза, миграции клеток, контроль активности НАД⁺-зависимых событий (активация сиртуинов, рианодиновых рецепторов, поли(АДФ-рибозил)полимеразы и пр.) [423]. Ранее нами было показано, что максимальное число CD38-экспрессирующих астроцитов наблюдается в ранний постишемический период при ишемическом повреждении головного мозга, что отражает выраженность реактивного астроглиоза [64]. Таким образом, увеличение экспрессии CD38 и CD157 на клетках астроглиальной природы может свидетельствовать об активации астроцитов при действии токсического агента – Аβ.

Вместе с тем, не менее вероятной представляется роль НАД⁺-конвертирующих ферментов в регуляции локального микроокружения в нейрогенных нишах, контролирующего процессы пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза клеток нейрональной и глиальной природы [244]. Известно, что совместное культивирование астроцитов и нейронов приводит к значительному увеличению экспрессии астроцитарного CD38 как на плазматической мембране, так и внутриклеточно, что связывают с действием глутамата, высвобождающегося из активированных нейронов, на Астроциты [370]. Аккумуляция кальция в цитоплазме астроцитов опосредует астроглиальную регуляцию локального микроциркуляторного ответа в пределах нейроваскулярной единицы, что, в свою очередь, во многом определяется активностью гликолитических процессов и отношением концентраций НАД⁺ и НАДН в цитозоле астроцитов [296]. В этом контексте, функциональная активность CD38 и CD157 может быть актуальна для поддержания уровня НАД⁺, адекватного потребностям клеток-предшественников нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга.

Кроме того, как было недавно показано, CD38 регулирует уровень Аβ в головном мозге *in vitro* посредством фермент-зависимого механизма. Так,

было показано, что снижение экспрессии CD38 приводит к снижению уровня A β путем ингибирования активности амилоид-генерирующих секретаз [69].

Таким образом, развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа у экспериментальных животных после инъекции бета-олигомеров сопровождается увеличением экспрессии НАД⁺-конвертирующих ферментов – CD38 и CD157 в клетках астроглиальной, но не нейрональной природы в нейрогенных нишах головного мозга.

Полученные результаты определяют потенциальные возможности для использования CD38 и CD157 в качестве молекул-мишеней для терапии нейродегенерации или направленной регуляции процессов нейрогенеза во взрослом мозге.

4.2. Гиппокампальный нейрогенез после инъекции олигомеров бета-амилоида. Экспрессия NLRP3 инфламмасом и медиаторов воспаления в нейрогенных нишах в норме и при нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией

Ранние изменения в гиппокампальном нейрогенезе, вызванные инъекцией олигомеров бета-амилоида: влияние на процессы кратковременной и отсроченной памяти.

Основными клиническими проявлениями БА являются снижение когнитивных функций и другие психические и эмоциональные нарушения. Эксперименты на животных показали снижение способности к обучению и памяти, включая пространственную память и потерю эмоциональной памяти [368].

Как было описано ранее формирование условного страха происходит в результате появления нейтрального стимула (звук), за которым следует опасный безусловный стимул (шок). После нескольких тренировок нейтральные стимулы могут быть преобразованы в условные. Формирование условных страхов вызывает некоторые поведенческие и физиологические

реакции. Эти реакции обычно являются защитными реакциями (например, замирание), которые происходят, когда животное подвергается опасности или возникающему страху [184]. В отличие от пространственного обучения и памяти, суть формирования памяти эмоций страха заключается в том, что некоторые непосредственные стимулы запускают активацию гиппокампа (длительное потенцирование) и миндалина, а также интеграцию всех трех факторов. Патологические механизмы БА обычно связаны с сокращением времени защитного ответа, что указывает на снижение эмоциональной памяти [184]. Тем не менее, некоторые исследования показали, что длительность замирания может быть больше у мышей с нейродегенерацией. Предполагается, что путь миндалина-гиппокамп поврежден и появляется повышенная чувствительность к страху, что проявляется более выраженным страхом [447].

В связи с этим остается актуальным изучение эмоциональной памяти, ассоциированной с гиппокампом и миндалиной при БА. Кроме того, представляет интерес исследование недавней и отсроченной памяти при токсическом действии олигомеров бета-амилоида. На этапе приобретения памяти выявлены нарушения у мышей с инъекцией бета-амилоида: кривая обучения продемонстрировала характерные для нарушений в гиппокампе изменения. Во второй контекстный день мыши с моделированием болезни Альцгеймера также замирали меньше, что свидетельствует о патологии ассоциативной недавней памяти. В третий сигнальный день мыши после введения олигомеров бета-амилоида не сумели связать подаваемый шум с новым контекстом. Аналогичные нарушения наблюдались и в отсроченном периоде.

В последнее время появилось большое число публикаций, посвященных исследованию процессов нейрогенеза во взрослом мозге при нейродегенерации, а в частности при болезни Альцгеймера. Для таких исследований используются различные модели данной патологии. Согласно данным литературы болезнь Альцгеймера влияет на нейрогенез, тем не менее

направление таких изменений все еще остается предметом споров. Значительная часть современных исследований демонстрирует, что отложение бета-амилоида негативно влияет на нейрональные стволовые клетки [210], в то время как существуют и противоположные мнения.

Согласно полученным нами данным, в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа происходит снижение количества пролиферирующих клеток, которое мы определили по снижению уровня маркера Ki67. Такое сокращение может быть показателем сокращения активированных стволовых клеток в нейрогенной нише и как следствие сокращения регенеративного потенциала. Исследования Naughey et al. [164] демонстрируют корреляцию между развитием отложений бета-амилоида и подавлением пролиферации нейрональных прогениторных клеток. Однако некоторые другие сообщения указывают на то, что подавление пролиферации, инициированное на стадиях, предшествующих осаждению, когда растворимые олигомеры бета-амилоида уже обнаруживаются в головном мозге [406]. Кроме того, наблюдается устойчивая корреляция между уровнями растворимого A β и степенью синаптической потери и тяжести когнитивных нарушений. Эти клинические данные подтверждаются и доклиническими исследованиями, демонстрирующими, что когнитивные функции, по-видимому, ухудшаются именно из-за растворимых олигомерных A β , а не отложений A β [265]. В линии трансгенных мышей Tg2576, которая экспрессирует ген APP, растворимые олигомерные A β 1-42 формы могут быть обнаружены по меньшей мере за 3 месяца до осаждения нерастворимого A β в возрасте 9 месяцев [265]. На этой стадии предварительного осаждения скорость пролиферации нейрональных прогениторных клеток в зубчатой извилине была уже уменьшена, как это было на более поздних стадиях, когда стали появляться отложения A β [96]. Аналогичным образом, в отдельной линии с двойными мутациями APP было обнаружено снижение пролиферации клеток и нейробластов в субгранулярной зоне, зафиксированное также в возрасте 3 месяцев, когда наблюдались отложения A β в лобной коре, но не в гиппокампе [333].

Тем не менее, существует другая точка зрения, согласно которой пролиферация нейрональных стволовых/прогениторных клеток и нейрогенез в целом усиливаются в присутствии А β -пептида. Одно из ключевых исследований показало увеличение нейрогенеза в гиппокампе посмертно в мозге пациентов с БА. Экспрессия маркеров ранних этапов нейрогенеза (нейробласты - TUC-4 и DCX) была увеличена в субгранулярной зоне, а также в гранулярной зоне гиппокампа у пациентов с БА по сравнению с здоровым контролем [193], что свидетельствует об усиленном нейрогенезе. Дальнейшие исследования с использованием трансгенных моделей на мышах подтвердили такие результаты, а именно они продемонстрировали значительно большее количество BrdU-иммуноположительных клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины 3-месячных мышей, а также у годовалых трансгенных мышей.

Аналогичные результаты усиленного нейрогенеза были получены в исследованиях *in vitro* с культивируемыми НСК из стриатума и гиппокампа крысы и мыши [257]. Клетки обрабатывали различными концентрациями А β пептида в разные моменты времени. Наблюдалось в среднем трехкратное увеличение числа нейронов. Однако было отмечено, что увеличение было временным и зависимым от дозы. Кроме того, скорость распространения пролиферирующих НСК в культуре оставалась неизменной, что свидетельствует о том, что А β действует на нейрональные предшественники, а не на нейрональные стволовые клетки. Эти результаты показывают, что отложение А β может заставить нейрональные стволовые/прогениторные клетки дифференцировать, а не пролиферировать, что в конечном итоге может истощать пул стволовых клеток [389]. Зафиксированное снижение мультипотентных стволовых клеток, экспрессирующих Nestin, также указывает на сниженное число НСК.

Таким образом, полученные нами данные могут свидетельствовать об истощении пула стволовых клеток в субгранулярной зоне гиппокампа при

токсическом действии растворимых олигомерных форм бета-амилоида еще до появления отложений бета-амилоида.

Следующим этапом был изучен процесс миграции вновь образованных клеток, используя не только иммуноокрашивание с целью детекции нейробластов (PSA-NCAM⁺ клеток), но протокол с введением бромдезоксисуридина для более точного исследования характера миграции и определения местоположения вновь образованных клеток. В ходе проведенного эксперимента получены данные, которые не указывают на снижение количества вновь образованных клеток, поскольку количество BrdU-позитивных клеток не сокращалось по сравнению с группой контроля.

По данным литературы хорошо известно, что незрелые нейроны во взрослом гиппокампе являются электрофизиологически активными, они очень возбудимы и модулируют активность гиппокампа. Более того, они необходимы для обучения, поскольку их истощение при экспериментальной модели патологии на животных препятствует успешному пространственному обучению [403].

Важно подчеркнуть, что подавляющая часть исследований ориентирована на исследование этапов образования НСК, их распространения и последующего выбора клеточной судьбы. Однако требует пристального внимания и процесс формирования новых зрелых нейронов и их выживаемости. Так процессы пролиферации НСК и дифференцировки клеток являются всего лишь двумя ранними этапами в нейрогенезе, а большое число вновь образованных нейронов не доживает до своего созревания и интеграции в нейрональные цепи, изменения в скоростях этих двух ранних этапов могут не отражать полного исхода процесса нейрогенеза. В настоящее время наиболее целесообразным является изучение критических точек в нейрогенезе [97]. В исследованиях на трансгенных мышах было показано, что скорость пролиферации в субгранулярной зоне не изменяется в возрасте 2 месяцев, но значительно сокращается в возрасте 1 года, когда у таких мышей наблюдается отложение сенильных бляшек. Тем не менее важно подчеркнуть, что число

пролиферирующих клеток не коррелировало с числом бляшек, что подтверждает, что снижение пролиферации не зависит от накопления нерастворимого бета-амилоида или осаждения бляшек. Однако уменьшение пролиферации сопровождалось уменьшением общего числа DCX+ нейробластов в субгранулярной зоне. В текущем же исследовании не было обнаружено сокращения вновь образованных клеток. Но, так как исследовали не только число нейробластов, но и паттерн их миграции, то согласно классической схеме радиальной миграции в гранулярный слой зубчатой извилины из субгранулярного слоя, клетки, инкорпорирующие BrdU, должны быть обнаружены и в наружном гранулярном слое. Тем не менее важной находкой является то, что в наружном гранулярном слое, в который мигрируют вновь образованные клетки из субгранулярной зоны, количество 6-дневных BrdU+ клеток было значительно меньше по сравнению с контролем. Это нехарактерно для нормального нейрогенеза во взрослом мозге и может свидетельствовать о патологичном процессе радиальной миграции, несмотря на сохраненное образование новых клеток. Таким образом, клетки остаются в субгранулярном слое или же происходит их миграция вдоль субгранулярной зоны. В связи с этим эта находка указывает на нарушенную миграцию и эктопическую дифференцировку нейронов, и как следствие, на патологичную, по всей видимости, выживаемость нейронов.

В литературе имеются описания нарушений расположения нейронов, их морфологии и другие изменения мышей с БА. Так было показано, что для такой патологии характерно уменьшение объема самого гиппокампа, а также сокращение числа клеток в гранулярном слое, уменьшения его толщины, а также снижение плотности гранулярных нейронов. Важно подчеркнуть, что сокращенный объем гранулярного слоя предшествовал отложению A β бляшек [324]. В текущем исследовании было отмечено увеличение числа клеток в апоптозе в субгранулярном и гранулярном слое зубчатой извилины, а также в хилусе.

Ранее было показано, что болезнь Альцгеймера напрямую связана с клетками гиппокампа, а корреляция между апоптозом нейронов в коре головного мозга и гиппокампе наблюдаются как в клинических исследованиях, так и экспериментах на животных. Кроме того, в таких исследованиях было продемонстрировано, что процесс апоптоза играет ключевую роль в истощении клеток гиппокампа и способствует ухудшению когнитивных функций [181].

Таким образом, данное исследование представляет собой результаты, указывающие на повреждение критических этапов нейрогенеза: снижение числа активированных, активно пролиферирующих стволовых клеток, прогениторной, нейробластной стадии радиальной миграции, стадии интеграции незрелых нейронов и выживаемости нейронов, которые наблюдаются при действии растворимых форм олигомеров бета-амилоида 1-42. Полученные данные указывают на снижение скорости пролиферации в СГЗ, которое приводит к нарушенной дифференцировке и эктопической миграции, продуцируя, по-видимому, аномальные нейроны, которые имеют более низкие уровни выживаемости, что в конечном итоге может приводить к уменьшению зрелых нейронов и числа клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (Рисунок 129).

События и стадии нейрогенеза на стадии предварительного осаднения до формирования отложений Аβ (ранние стадии БА)

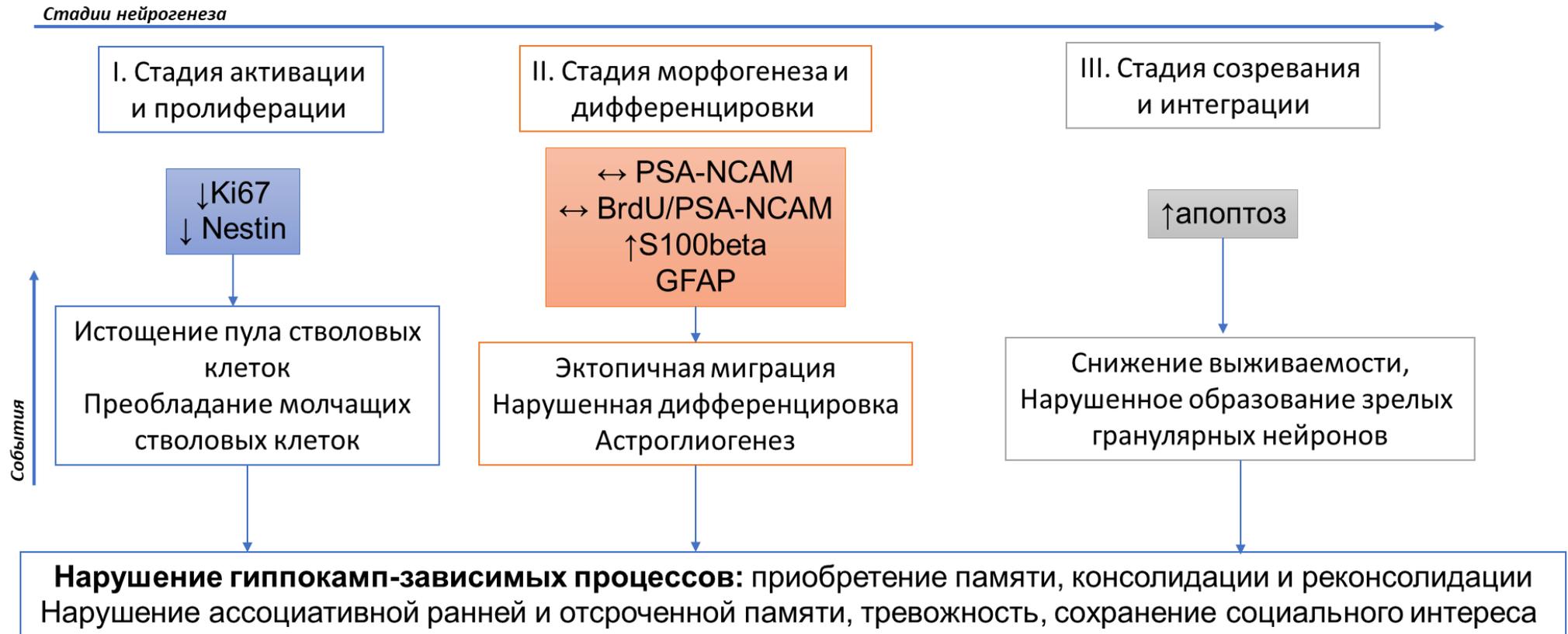


Рисунок 129 – События и стадии нейрогенеза на стадии предварительного осаднения до формирования отложений Аβ (ранние стадии БА).

Экспрессия NLRP3 инфламмасом и медиаторов воспаления в нейрогенных нишах в норме и при нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией.

Поскольку болезнь Альцгеймера характеризуется не только повреждением процессов нейрогенеза, что приводит к нейродегенерации, но и сопровождается нейровоспалением, изучение некоторых молекул, а также клеток-продуцентов, которые могут участвовать в реализации реакций воспаления, остается до сих пор актуальным [119].

Также в ходе данного исследования были описаны типичные для нейродегенерации изменения в экспрессии маркеров астроцитов. Характерная картина реактивного астроглиоза была отмечена в СГЗ мышей с инъекцией бета-амилоида. Ранее также было показано, что трансгенные мыши с БА имеют более реактивную глию вокруг бляшек А β [43], а также, что нейротоксичность А β может быть усилена микроглией или астроцитами.

В ходе исследования числа S100 β + клеток, которые маркируют собой т.н. протоплазматические астроциты, обнаружено значимое увеличение при моделировании БА. S100beta является кальций-связывающим белком, который продуцируют астроциты. Кроме того, было показано, данный маркер может быть использован в качестве диагностического при болезни Альцгеймера [67]. S100beta экспрессируют преимущественно астроциты, входящие в состав нейроваскулярной единицы головного мозга (т.н. протоплазматические астроциты) [9]. Таким образом, увеличение экспрессии S100beta может свидетельствовать о том, что именно S100beta-иммунопозитивные (протоплазматические, ассоциированные с нейроваскулярной единицей) астроциты в пределах нейрогенных ниш реагируют на нейротоксическое действие олигомеров бета-амилоида.

В настоящее время рассматривается дуальная роль воспаления в головном мозге при развитии нейродегенерации. Во-первых, отложение сенильных бляшек сопровождается релизингом провоспалительных цитокинов реактивными микроглиальными клетками и, скорее всего,

астроцитами, которые окружают А β бляшки. Это приводит к нейротоксическому эффекту, который способствует ухудшению когнитивного потенциала. Во-вторых, высвобождение провоспалительных факторов способствует активации защитных механизмов, поскольку реактивность глиальных клеток увеличивает фагоцитоз и клиренс амилоида [342].

Длительное накопление и агрегация А β пептида стимулирует глиальные клетки секретировать провоспалительные цитокины и другие медиаторы воспаления при болезни Альцгеймера. При нейродегенерации, сопровождающейся нейровоспалением, экспрессия инфламмасом, в основном, изучалась на клетках микроглии. Несмотря на то, что большинство исследований, посвященных возможному влиянию микроглиального воспаления при БА, недавние исследования показывают, что именно астроцитарное воспаление может играть ключевую роль.

Как уже было описано ранее NLRP3 инфламмосомы представляют собой мультипротеиновый комплекс, в основном экспрессируемый в миелоидных клетках, который играет существенную роль в А β -индуцированной активации каспазы-1 и последующей секреции двух ее субстратов, провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [352] приводя к гибели нейрональных клеток. Однако эти цитокины также играют полезную роль в развитии воспаления и устранении вредных веществ. Гиперпродукция IL-1 и IL-18 связана с воспалительными и аутоиммунными заболеваниями. Предыдущие исследования показали, что экспрессия NLRP3 и каспазы-1 значительно повышена в мозге пациентов с БА. При этом описано, что делеция гена *Nlrp3* и каспазы-1 усиливает клиренс А β в мозге БА. Вокруг бляшек А β присутствует большое количество микроглиальных клеток, показывающих, что именно микроглия играет главную роль в клиренсе амилоидных отложений под действием фагоцитов. Однако с развитием БА глиальные клетки адаптируются к отложению бета-амилоида и может вырабатываться меньше цитокинов, что нарушает функцию клиренса микроглии [322].

При нейродегенерации, сопровождающейся нейровоспалением, экспрессия инфламмасом, в основном, изучалась на клетках микроглии. Несмотря на то, что большинство исследований, посвященных возможному влиянию микроглиального воспаления при БА, недавние исследования показывают, что именно астроцитарное воспаление может играть ключевую роль [328].

Одной из задач текущего исследования состояла в том, чтобы выделить и количественно определить колокализацию выделяемого IL-1 β и NLRP3 с помощью клеточно-специфических маркеров глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), и кальций-связывающего белка s100beta (s100beta), чтобы выделить клеточный источник индуцированного растворимыми олигомерами провоспалительного ответа. IL-1 β может экспрессироваться многими типами клеток головного мозга, включая микроглию, астроциты и нейроны [195]. Важным компонентом для лучшего понимания механизма, посредством которого гиппокампальный ИЛ-1 может влиять на поведенческие результаты после инъекции бета-олигомеров, является выявление того, какой тип(ы) астроцитов его продуцирует.

Так не было выявлено увеличения экспрессии NLRP3 инфламмасом протоплазматическими S100beta⁺ астроцитами, но при этом зафиксировано увеличение экспрессии NLRP3 инфламмасом и IL1 β фиброзными астроцитами, экспрессирующими GFAP.

Результаты недавних исследований подтверждают, что индукция выраженного воспалительного ответа сопровождается увеличением экспрессии S100 beta и выделении цитокинов глиальными клетками при прогрессировании рассеянного склероза [35]. Также при этой патологии увеличение экспрессии S100beta ассоциировано с повреждением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [220]. Дальнейшие исследования необходимы для подтверждения использования этой молекулы не только в качестве молекулы-маркера нейродегенерации, но и повреждения проницаемости ГЭБ при нейродегенерации.

Следует особо отметить, что противоречивыми остаются данные по роли экспрессии астроцитами интрелейкина 1. Только два последних

исследования показывают, что в астроцитах стимуляция воспаления также вызывает образование IL-1 β [436]. Также остается до конца неясной его роль в норме и при патологии. Была описана двойная роль IL-1 β : при высвобождении в низких концентрациях и при гомеостатических условиях IL-1 бета активирует астроциты для продуцирования BDNF и TNF, а также дополнительного глутамата и лактата, все из которых важны для долговременной консолидации памяти [147]. Goshen и его коллеги продемонстрировали, что физиологические уровни IL-1 способствуют формированию памяти, так что небольшое увеличение его уровня может даже улучшить память [147]. Однако любое отклонение от этого физиологического диапазона приводит к нарушению формирования памяти.

В данном исследовании также установлено, что не только реактивные астроциты при действии амилоида могут экспрессировать интерлейкин 1, но также и в контрольной группе животных в головном мозге в субгранулярной зоне гиппокампа была выявлена колокализация маркера астроцитов и интерлейкина. По всей видимости базальные уровни провоспалительных цитокинов необходим для процессов активного нейрогенеза и миграции клеток, что обеспечивает процессы консолидации памяти.

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

В ходе данного исследования была также изучена колокализация NLRP3 инфламмасом и плюрипотентных стволовых клетках, экспрессирующих CD133, а также Nestin⁺ мультипотентных стволовых клетках. Было зафиксировано, что инъекция олигомеров бета-амилоида приводит к увеличению экспрессии NLRP3 мультибелкового комплекса на обоих типах стволовых клеток. Это в свою очередь может свидетельствовать о том, что функциональная активность этих клеток меняется, реализуя воспалительный фенотип.

В норме в здоровом мозге также обнаружено, что НСК способны продуцировать NLRP3 инфламмосомы. В литературе имеются недавние сведения, что НСК способны регулировать активацию NLRP3 и секрецию IL-1 β , которые имеют решающее значение для инициации воспалительных реакций, следовательно, предотвращая высвобождение нейротоксических провоспалительных факторов микроглией [65].

Кроме того, некоторые исследователи полагают, что маркер CD133 может выступать также в роли маркера не только стволовых клеток, которые дают начало клеткам нейрональной или глиальной природы, но и могут быть эндотелиальными предшественниками [335].

Одно исследование говорит о том, что популяция CD133-позитивных клеток обладает способностью образовывать капиллярные трубки, поэтому возможно использовать данную молекулу для оценки ангиогенного потенциала головного мозга при развитии нейродегенерации [21].

В этой связи весьма важным является изучение как повышение уровня бета-амилоида в головном мозге влияет на эндотелиальные клетки-предшественники и формирование в них инфламмосом, а это в свою очередь на процессы ангиогенеза, структурную целостность ГЭБ и особенности формирования нейровоспаления. Из-за своего стратегического расположения эндотелиальные клетки способны взаимодействовать с другими клетками как в кровотоке, так и в стенке сосуда, в то время как обширная площадь поверхности эндотелия является оптимальным местом для взаимодействия «клетка-клетка» и «клетка-матрикс» [402].

Таким образом, синергический эффект глиальной активации с экспрессией S100beta, индуцированный инъекцией бета-олигомеров, а также провоспалительный фенотип клеток-предшественников эндотелиальных клеток объединяются вместе для формирования сложного самоактивирующегося порочного круга, способного приводить к дальнейшей дисфункции нейроваскулярной единицы (Рисунок 130).

Компоненты нейрогенной ниши на ранней стадии БА

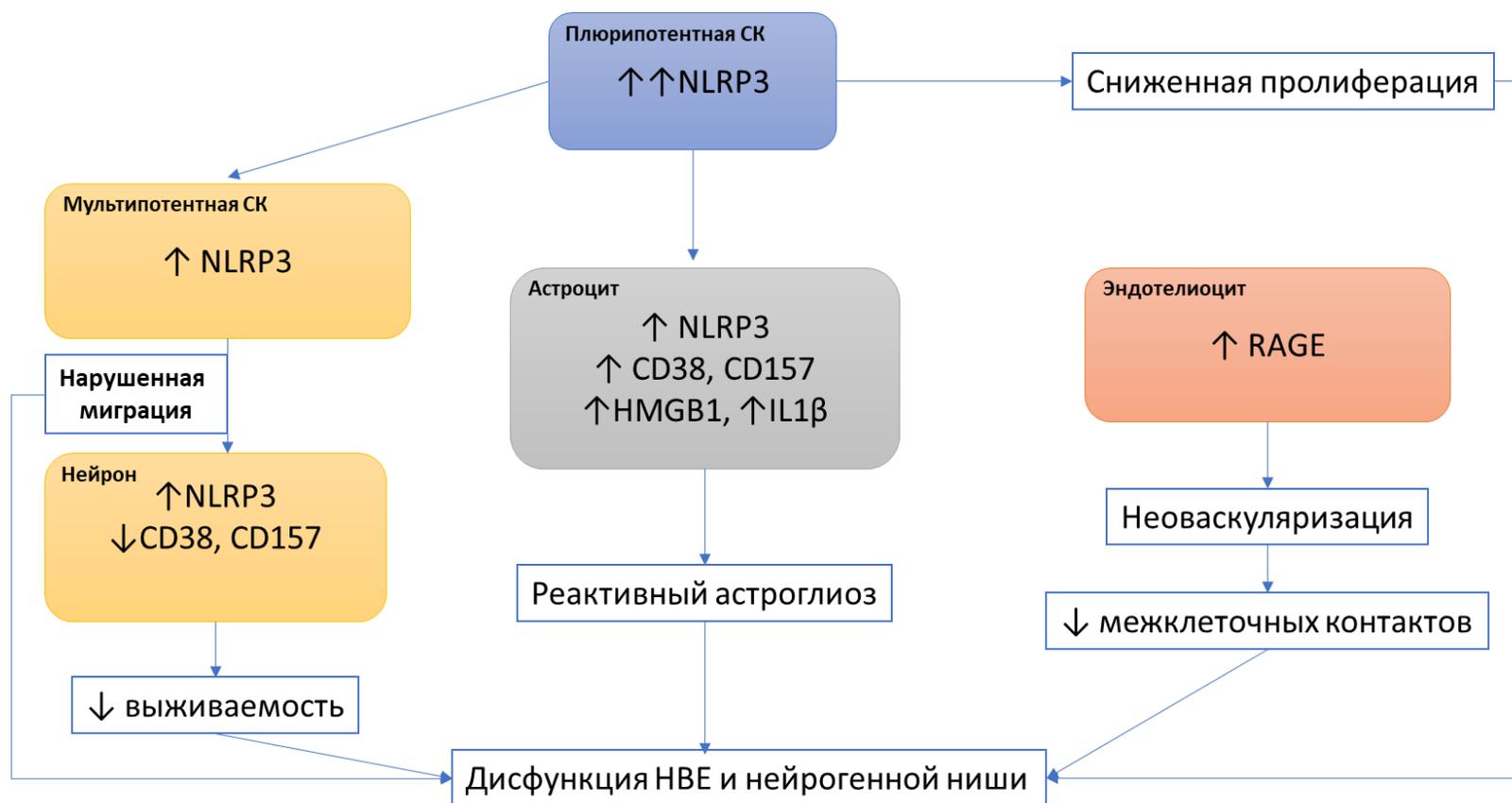


Рисунок 130 – Компоненты нейрогенной ниши на ранней стадии БА.

4.3. Экспрессия NLRP3 инфламмасом на клетках нейрональной и глиальной природы в пределах нейрогенной ниши в семейной модели болезни Альцгеймера. Эмоциональная ранняя и отсроченная память у мышей с семейной формой болезни Альцгеймера

Поведенческая оценка общей и исследовательской активности и тревожности у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (5xFAD)

При изучении поведения мышей с семейной формой болезни Альцгеймера выявили снижение общей локомоторной активности за счет снижения общей пройденной дистанции, а также снижения исследовательской активности, установленной по сокращенному числу входов в центральную зону и уменьшением дистанции в данной зоне. Кроме того отмечено предпочтение мышами с БА проводить большую часть времени на периферии, проявляя тревожность, поскольку у животных с преимущественно тревожным поведением и беспокойством отмечается специфичная траектория с преобладанием движения по периферии поля [353]. Однако, несмотря на сохраняющуюся тревожность и беспокойство в открытом пространстве, тем не менее мыши с БА проявляют интерес к несоциальному объекту.

При помещении центр в открытого поля неживого (несоциального объекта) проводили оценку исследовательской активности. В следующей сессии экспериментов в центр поля вместо несоциального объекта помещали социальный (другую особь) для изучения социального интереса и предпочтения [255].

В совокупности полученные данные свидетельствует в пользу того, что на ранних стадиях БА, несмотря на проявления тревожности и беспокойства, мыши, тем не менее сохраняют социальный интерес и проявляют поисковую и исследовательскую активность.

Эмоциональная ранняя и отсроченная память у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (5xFAD)

Зафиксированные нарушения эмоциональной памяти после инъекции бета-амилоида в гиппокамп головного мозга были подтверждены и при анализе поведения трансгенных мышей с БА.

Общепризнанным считается, что сигнальный день в тесте «Условно-рефлекторного замирания» характеризует память, зависимую от миндалины, в то время как контекстный тест на обусловленность страха считается зависимым от гиппокампа [426]. В настоящем исследовании мы сначала подтвердили изменения в эмоциональном поведении, а именно характер замирания в ответ на раздражители у мышей с 5xFAD моделью. Так обнаружено нарушение гиппокамп-зависимого этапа приобретения памяти (первый день тестирования) у трансгенных мышей.

В настоящее время имеются в литературе данные многих исследований, оценивающих эмоциональную память при БА, однако результаты носят разрозненный характер [426]. Так в одном исследовании было показано, что в трансгенной двойной APP / PS1 модели БА имеются нарушения, ассоциированные с миндалиной головного мозга. Так было продемонстрировано, что трансгенные мыши показали худшие результаты в памяти, доминирующей в миндалине в раннем возрасте, в то время как память, доминирующая в гиппокампе, оставалась нетронутой до 4-месячного возраста [251].

Во второй контекстный день трансгенные мыши замирали меньше, что свидетельствует о патологии ассоциативной недавней памяти. В третий сигнальный день мыши после введения олигомеров бета-амилоида не сумели связать подаваемый шум с новым контекстом, при этом следует особо отметить, что мыши замирали почти все время в новом контексте не ассоциируя подачу белого шума с безусловным раздражителем. После предъявления стимула в виде шума трансгенные мыши сохраняют высокий уровень замирания, что скорее всего связано не с извлечением памяти, а с

общей повышенной тревожностью, поскольку этот показатель не отличается от процента замирания до предъявления шума.

Аналогичные нарушения наблюдались и в отсроченном периоде.

Особенности экспрессии NLRP3 инфламмасом в GFAP+ астроцитах и NeuN+ гранулярных нейронах мышей с трансгенной моделью болезни Альцгеймера (5xFAD)

Как уже было отмечено, БА патологически характеризуется отложением бета-амилоида А β . Депонирование А β , который является молекулярным фрагментом, ассоциированным с повреждениями (DAMPs), также известным как молекулярный фрагмент, ассоциированный с опасностью, вызывают последующее повреждение нейронов. Это приводит к запуску каскада воспалительных реакций, которые инициируют врожденный иммунный ответ [338]. Во многих исследованиях было показано, что уровни мРНК компонентов NLRP1 и NLRP3 увеличиваются при БА [346]. NLRP индуцирует каспазу-1 и каспазу-6, и этот путь участвует в прогрессировании БА [205]. В дополнение к более низким уровням активности каспазы-1 и IL-1 и увеличенному клиренсу А β , *Nlrp3*^{-/-} мыши обладают лучшей памятью, чем мыши дикого типа. Кроме того, подавление NLRP3 способствует смещению микроглии M1-типа к типу M2. Это помогает в очистке А β и ремоделировании ткани в модели APP/PS1, поскольку микроглия M2-типа эффективна при фагоцитозе [167]. Механизм активации NLRP3 еще предстоит выяснить; однако, в клетках микроглии было показано, что инфламмосомы NLRP3 активируются не только А β через путь TLR4-MyD88-NF- κ B в микроглии, но также P2X7R рецепторы. Кроме того, было показано, что NLRP10, другой NOD-подобный рецептор, ослабляет индуцированную А β активацию каспазы-1 и высвобождение IL-1 β [284].

Тот факт, что сверхэкспрессия эффекторов воспаления, IL-1 и IL-18, инициирует воспалительный процесс у пациентов с БА, подтверждает связь между воспалением и БА [253]. Ранее было продемонстрировано, что

сигнальный каскад IL-1 β является важным патогенетическим фактором БА; было показано, что его блокада улучшает патологические изменения в модели БА на мышах [219]. В исследовании Craft et al. было показано, что нокаутирование антагониста рецептора IL-1бета при БА усугубляет невропатологические последствия. Вышеупомянутые исследования показывают, что ингибирование активации воспаления может быть потенциальной терапевтической мишенью для болезни Альцгеймера [235].

Хотя большинство исследований до сих пор были сосредоточены на возможном участии микроглиальных инфламмасом при моделировании болезни Альцгеймера, недавние исследования показывают, что астроцитарные инфламмасомы, а по нашему мнению и нейрональные, могут играть роль в прогрессировании заболевания [235]. В настоящем исследовании было уделено внимание изучению экспрессии NLRP3 инфламмасом в клетках нейрональной и астроглиальной природы. Мы исследовали роль NLRP3-опосредованной активации инфламмасом на поведение животных, экспрессию интерлейкина 1, а также роль фенотипа *Nlrp3*^{-/-} на формирование астроцитов.

Таким образом, семейная форма болезни Альцгеймера (трансгенная модель 5xFAD), также как и инъекционная модель, индуцированная введением бета-олигомеров в гиппокамп, сопровождается увеличением экспрессии NLRP3 инфламмасом в астроцитах и нейронах гиппокампа. В свою очередь, такое увеличение экспрессии NLRP3 приводит к увеличению высвобождения провоспалительного интерлейкина 1 бета.

4.4. Эффект введения олигомеров бета-амилоида на экспрессию генов раннего реагирования после тестирования когнитивных функций.

Экспрессия маркеров ангиогенеза и RAGE

Экспрессию продукта гена раннего реагирования *c-fos* изучают сразу же после стимуляции когнитивной деятельности. Для этого был проведен тест «Распознавание нового объекта», который также позволил оценить рабочую память, предпочтение новизны и уровень тревоги у мышей после инъекции олигомеров бета-амилоида [30]. Мыши после введения растворимых форм бета-амилоида испытывают стресс новизны и демонстрируют тревожное поведение, а также обладают сниженной способностью к запоминанию расположения объектов в пространстве, что указывает на когнитивный дефицит.

Снижение когнитивной функции сопровождается заметным сокращением иммунореактивности белка *c-fos* в гиппокампе. Данный белок играет важную роль в гиппокамп-зависимой синаптической пластичности и памяти [275].

Согласно данным литературы известно, что пространственное обучение индуцирует экспрессию генов раннего реагирования, таких как *c-fos* и *Arc* в гиппокампе крыс [264]. Однако, также было показано, что в гиппокампе и коре головного мозга при экспериментальной модели семейной формы БА на трансгенных мышах линии APP^{swE}/PS1^{ΔE9}, которые имеют мутации в APP и пресенилине, обнаруживают сниженные базальные и индуцированные уровни мРНК *c-fos* и *Arc* [73]

Экспрессия CD31 и JAM1 при моделировании болезни Альцгеймера

При изучении экспрессия молекул JAM1 и CD31 в гиппокампе мышей в норме и после введения растворимых форм олигомеров бета-амилоида выявлено увеличение CD31⁺ клеток.

Многочисленные исследования показывают, что дисфункция нейроваскулярной единицы способствует возникновению и

прогрессированию БА, и предлагают связь между цереброваскулярными изменениями и нейродегенерацией [341]. Отложение А β в сосудистой сети приводит к провоспалительным и цитотоксическим событиям, которые способствуют увеличенной проницаемости в мозге при БА [109].

Молекула адгезии эндотелиальных клеток (PECAM-1, CD31) представляет собой белок, который играет значительную роль в каскаде адгезии [197]. Поэтому он участвует во взаимодействии эндотелия и лейкоцитов и в трансэндотелиальной миграции лейкоцитов во время воспаления. Поскольку нейровоспаление и последующее разрушение гематоэнцефалического барьера являются неотъемлемыми процессами при многих неврологических расстройствах, PECAM-1 и его растворимая форма (sPECAM-1) были исследованы в ряде состояний. Например, было показано, что уровни PECAM-1 и sPECAM-1 в сыворотке и спинномозговой жидкости повышаются у пациентов с активными стадиями рассеянного склероза. Точно так же они повышаются у людей после ишемического инсульта. Также было показано, что PECAM-1 участвует в патогенезе нарушений мозгового кровообращения, ассоциированных с накоплением бета-амилоида, таких как болезнь Альцгеймера. Он участвует в патогенезе паранеопластических неврологических расстройств и в нейровоспалении [197]. Тем не менее было описано в литературе и снижение эндотелиального маркера CD31, наблюдаемое в мозге при БА, позволяет предположить, что во время прогрессирования заболевания наблюдается обширная дегенерация эндотелия [152].

Однако в текущем исследовании было показано, что при моделировании болезни Альцгеймера посредством инъекции олигомеров бета-амилоида происходит увеличение экспрессии CD31, что может свидетельствовать о повышенной неоваскуляризации в гиппокампе, индуцированной действием бета-амилоида. Вместе с тем, такие вновь формируемые эндотелиальные клетки, выстилающие сосуды, функционально неполноценны из-за снижения экспрессии белка межклеточных контактов JAM1.

Известно, что межклеточные контакты играют фундаментальную роль в целостности тканей, а также в проницаемости сосудов. Плотный соединенный монослой эндотелиальных клеток, образующих ГЭБ, обеспечивается комплексом плотных (TJs) и адгезивных контактов (AJs) [388].

JAMs являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (Ig). Есть несколько типов JAM молекул: JAM-A (JAM1), JAM-B и JAM-C. JAM-A на поверхности одной эндотелиальной клетки связывается с JAM-A на поверхности соседней клетки [130]. Исследования *in vitro* показали, что A β 1-42 подавляет экспрессию JAM-C в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC), но неясно какие изменения характерны для событий *in vivo*.

Кроме того, отсутствие функционально полноценных контактов между эндотелиальными клетками подтверждает нарушение целостности ГЭБ при нейродегенерации.

Экспрессия HMGB1 при моделировании болезни Альцгеймера

Известно, что HMGB1 является маркером нейровоспаления и высвобождается из некротических клеток [122]. В ходе диссертационного исследования было выявлено повышенная экспрессия HMGB1+ клеток в гиппокампе после инъекции растворимых форм бета-амилоида. Следовательно, моделирование болезни Альцгеймера посредством введения бета-амилоида приводит к увеличению маркера нейровоспаления HMGB1.

Согласно данным литературы HMGB1 играет роль в патогенезе БА. Так было показано, что HMGB1 индуцирует дегенерацию нейритов независимо от A β , но также модифицирует процессы агрегации A β и изменяет баланс между различными видами A β . Высвобождение HMGB1 из некротических нейронов с внутриклеточным распределением бета-амилоида предполагает, что HMGB1 зависит от внутриклеточной токсичности A β . Однако, как было показано в недавнем эксперименте, внеклеточная токсичность A β не считается вероятным механизмом. Учитывая, что HMGB1 высвобождается из гипервозбужденных нейронов независимо от A β , а HMGB1 явно

модифицирует полимеризацию А β и увеличивает количество олигомеров А β , HMGB1 также можно считать медиатором действия А β . Таким образом, скорее всего взаимодействие между А β и HMGB1 является двунаправленным. В этом отношении HMGB1 можно считать независимым медиатором БА, который имеет тесную связь с амилоидным каскадом [122].

Экспрессия RAGE при моделировании болезни Альцгеймера

Предыдущие исследования на моделях трансгенных мышей продемонстрировали повышенную экспрессию RAGE у мышей с таргентной гиперэкспрессией нейронов мутантной формы человеческого APP (mAPP) и повышенные уровни RAGE в нейронах и микроглии этих мышей по мере их старения и накопления А β . Гиперэкспрессия RAGE в нейронах или микроглии мышей mAPP сопровождается ускоренным накоплением А β и нарушение пространственного обучения / памяти, нейропатологические и биохимические изменения, характерные для БА. Эти наблюдения предполагают, что изменения уровней экспрессии RAGE могут влиять на вызванное А β клеточную дегенерацию, относящееся к развитию и прогрессированию БА. Однако механизмы вовлечения RAGE в образование А β не выяснены. Кроме того, неясно, обеспечит ли отсутствие RAGE защиту от накопления церебрального А β и дефицита рабочей памяти в мышинной модели БА. Этому разделу посвящен целый блок исследования данной диссертации, выполненной с использованием RAGE^{-/-} мышей.

Недавние исследования показали, что рецептор для конечных продуктов гликирования (RAGE) является сайтом связывания для А β [33]. RAGE представляет собой мультилигандный рецептор клеточной поверхности, который обычно экспрессируется в эндотелиальных клетках мозга и, на низких уровнях, в микроглии и нейронах. Однако в мозге БА экспрессия RAGE увеличивается в несколько раз в эндотелиальных клетках головного мозга, астроцитах, микроглии и нейронах. Было показано, что связывание А β с RAGE регулирует транспорт А β через ГЭБ, активирует провоспалительные цитокины и молекулы адгезии в церебральных эндотелиоцитах и способствует

транспорту A β с клеточной поверхности во внутриклеточное пространство в корковых нейронах [33].

В данном исследовании выявлено, что инъекция растворимых форм бета-амилоида приводит к увеличению экспрессии RAGE в клетках эндотелиоцитах. Известно, что накопление бета-амилоида в сосудистой сети головного мозга приводит к нарушению мембраны, дегенерация эндотелия и уменьшению размера просвета кровеносного сосуда [199]. При этом RAGE является основным фактором, опосредующим цитотоксичность бета-амилоида [68].

Таким образом, выявленное повышение экспрессии RAGE на эндотелиальных клетках в гиппокампе животных после инъекции олигомеров свидетельствует об активации воспалительного процесса, тем самым провоцируя запуск каскада патологических реакций, приводящих к окислительному стрессу, митохондриальной дисфункции, гибели нейронов, нарушению целостности ГЭБ и, как следствие, прогрессированию заболевания. В этой связи ослабление активности RAGE может ингибировать накопление бета-амилоида в кровеносных сосудах головного мозга и предотвращать нейротоксичность. Тем самым, RAGE может выступать в качестве терапевтической мишени для терапии БА путем ингибирования взаимодействия A β -RAGE.

4.5. Роль NLRP3 инфламмасом в процессах нейрогенеза и ангиогенеза, синаптической передачи и формировании астроцитов. Исследование поведенческого фенотипа мышей, не экспрессирующих NLRP3 инфламмасы

В этом исследовании описаны взаимосвязанные нейрофизиологические механизмы, которые достигают кульминации в отсутствие воспаления, опосредованного NLRP3 инфламмасомами у нокаутных мышей, а именно нарушение процессов раннего нейрогенеза и ангиогенеза, тревожное поведение и нарушение формирования условного рефлекса страха; уменьшение и изменение морфологии астроцитов в мозге; нарушение активации в аксонах пирамидных клеток зоны гиппокампа CA1 у мышей NLRP3 KO, особенно через коллатеральный путь Шаффера; и нарушение синаптической трансдукции в пирамидных клетках, опосредованное затруднением высвобождения нейротрансмиттера из пресинаптического сайта в CA3 зоне гиппокампа.

Согласно большинству последних исследований преобладает следующая точка зрения, что NLRP3-опосредованное воспаление играет роль в депрессивном поведении у грызунов при хроническом легком стрессе или стимуляции липополисахаридом [445], также оно участвует в развитии депрессии и тревоги, вызванных дефицитом эстрогена. В совокупности было продемонстрировано, что NLRP3-воспаление может быть потенциальной терапевтической мишенью для расстройств настроения, таких как депрессия [422]. Таким образом, все большее число фактических данных свидетельствует о том, что нейровоспаление, вызванное гиперпродукцией провоспалительных цитокинов в мозге, указывается в качестве основного фактора развития тревоги, когнитивной дисфункции и депрессии [344].

Тем не менее было показано, что провоспалительный цитокин IL-1 β играет критическую роль для формирования гиппокампальной зависимой памяти. Таким образом, IL-1 β активируется с помощью контекста,

формирующего страх [145] и LTP [330]. Но в то же время хроническая избыточная экспрессия IL-1 β в гиппокампе приводит к нарушениям пространственной памяти и реализации контекстного страха [273]. В литературе было также описано, что дефицит IL-1 β влияет на процесс формирования памяти в гиппокампе. Поэтому IL-1 β играет двойную роль: когда цитокин высвобождается в низких концентрациях и при нормальных физиологических условиях, то это важно для консолидации долговременной памяти посредством активации астроцитов с образованием нейротрофического фактора мозга (BDNF) и фактора некроза опухоли (TNF), а также высвобождения дополнительного глутамата и лактата, которые важны для долговременной консолидации памяти [145]. Согласно этим исследованиям физиологические уровни IL-1 β поддерживают формирование памяти, но любое отклонение от этого физиологического уровня приводит к нарушению когнитивной функции.

Хотя созревание интерлейкина-1 β опосредовано инфламмосомами, напротив, остается основная точка зрения, что *Nlrp3* нокаутные животные устойчивы к развитию депрессии [446] и защищены от когнитивных нарушений во время старения [434]. Подобно IL-1 β инфламмосомы также могут играть роль в процессах консолидации памяти, развития тревожности. В противном случае, как и IL-1-бета, NLRP3, оставаясь на низком базальном уровне, может поддерживать консолидацию памяти, которая была продемонстрирована в данном исследовании.

В данном исследовании было обнаружено, что делеция гена *Nlrp3* приводит к увеличению тревоги у мышей. Это было показано в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Темно-светлая камера». Кроме того, было продемонстрировано, что мыши, нокаутированные по *Nlrp3*, боятся новизны (сокращение времени в зоне с новым объектом, увеличение времени в центральной зоне приподнятого крестообразного лабиринта, а также отсутствие социального предпочтения

новизны. Полученные данные позволяют сделать вывод о повышенной тревожности у нокаутированных по *Nlrp3* мышей.

Мыши дикого типа с низкой степенью экспрессии NLRP3 инфламмасом продемонстрировали нормальное поведение в тесте условно-рефлекторного замирания, сохраненную способность приобретения памяти во время тренировки, что соответствует электрофизиологическим данным, тогда как у мышей с делецией *Nlrp3* также была нарушена функция гиппокампа. Хорошо известно, что синаптическая передача в гиппокампе играет ключевую роль в определении output паттерна отдельных нейронов [285]. Были сделаны внеклеточные записи локальных возбуждающих полевых постсинаптических потенциалов в ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера в срезах гиппокампа, потому что они обеспечивают надежную и стабильную меру возбуждающей синаптической передачи. Среднее отношение ввода-вывода, записанное в срезах *Nlrp3* нокаутных мышей в CA1 зоне, было ослаблено по сравнению с срезами WT. Полученные данные показали снижение амплитуды возбуждающих полевых постсинаптических потенциалов в пирамидальных клетках CA1 зоны и уменьшение времени нарастания в CA3 поле. Учитывая, что CA1-пирамидные нейроны с меньшей вероятностью запускаются при возбуждении у *Nlrp3^{-/-}* мышей *in vivo*, можно заключить, что глутаматергическая синаптическая передача в этом пути также может быть нарушена. Дефицит синаптической передачи CA3-CA1 коллатералей Шаффера приводит к сниженному возбуждению CA1-пирамидных нейронов [285]. Поэтому можно предположить, что возбуждение в CA1 зоне у *Nlrp3^{-/-}* мышей снижено.

Ранее было показано, что обе области CA1 и CA3 гиппокампа способствуют получению зависимого от контекста приобретения памяти, но для извлечения контекстной памяти требуется только область CA1 [191]. Таким образом, нарушенная синаптическая передача в поле CA 1 мышей, нокаутированных по *Nlrp3*, может привести к измененному выполнению контекстного теста, что и было продемонстрировано в настоящем

исследовании. Следует отметить, что CA1 зона отвечает не только за формирование памяти, но и за беспокойство и социальное взаимодействие.

CA3 – это регион, который, как полагают, поддерживает ассоциативный поиск [99]. Кроме того, было показано, что вентральный гиппокамп вовлечен в социальное взаимодействие грызунов и защитное поведение [117]. Было продемонстрировано в группе *Nlrp3^{-/-}* мышей в CA3 зоне гиппокампа более медленное время нарастания по сравнению с контролем WT, которое характеризует меру силы возбуждающей синаптической передачи. Таким образом, в зоне CA3 у *Nlrp3^{-/-}* мышей выявлено нарушение (слабая) синаптическая передача.

Синаптическая передача и пластичность в рекуррентной сети в CA3 имеют решающее значение для быстрой ассоциации разнообразной информации и соотнесения с действием. CA1 может способствовать распознаванию новизны события или контекста. Выход CA3 также может помочь поддерживать соответствующие уровни возбудимости во время новизны. Слабая сила возбудимости в CA3-зоне гиппокампа у *Nlrp3^{-/-}* мышей может объяснить дефицит в новом контексте в тесте условно-рефлекторного замирания, а также отсутствие социальной новизны в трехкамерном [231].

NLRP3 инфламмосомы в процессах нейрогенеза и ангиогенеза

Регуляция нейрогенеза гиппокампа на сегодняшний день остается слабо изученной, но, известно, что играет решающую роль в процессах познания, обучения, расстройствах эмоциональной сферы и настроения [54].

Известно, что нейровоспаление снижает нейрогенез. В одном исследовании приводятся данные, что этанол вызывает нейровоспаление, подтверждая гипотезу о том, что этаноловая индукция нейровоспаления способствует ингибированию нейрогенеза. В исследовании была продемонстрирована ключевая роль сигнальной трансдукции провоспалительного цитокина IL-1 β в опосредовании ингибирования нейрогенеза этанолом. Нарушения в нейрогенезе были связаны с сильной индукцией IL-1 β и воспалительных белков NALP1 и NALP3 (NLRP3) как в

нейронах, так и в астроцитах. Блокада синтеза IL-1 β с помощью ингибиторов воспаления значительно реверсирует ингибированный нейрогенез [453].

Таким образом, в современной литературе доминирующей является точка зрения, что ингибирование нейровоспаления путем подавления активности NLRP3 инфламмасом приводит к увеличению нейрогенеза. Однако не рассмотренным остается вопрос роли базальной экспрессии NLRP3 в процессе постнатального нейрогенеза в субгранулярном слое зубчатой извилины, которому и была посвящена часть исследования, а именно каким образом NLRP3 формируют микроокружение в нейрогенной нише для образования новых клеток.

Было убедительно продемонстрировано, что у мышей, не экспрессирующих NLRP3 инфламмасы, наблюдаются нарушения ранних этапов нейрогенеза. А именно отмечается снижение числа активированных стволовых клеток, DCX⁺ клеток, а также NeuroD⁺ нейронов. Известно, что DCX, который экспрессируется только на ранней стадии дифференцировки, служит маркером новообразованных нейронов в DG у взрослых. Кроме того, DCX экспрессируется нейрональными клетками-предшественниками и важен для миграции нейронов, процесса, критического для развития мозга и восстановления после повреждений [206]. Важно отметить, что нейрогенез тесно ассоциирован с DCX, который связан с неврологической функцией, включая память [454].

В связи с этим логично предположить, что делеция гена *Nlrp3* приводит к сниженному регенеративному потенциалу за счет сокращения числа активированных НСК. Кроме того, на основании полученных данных справедливо заключить о значительном сокращении вновь образованных нейронов в зубчатой извилине, нарушениях процессах миграции и выживаемости нейронов. Таким образом, базальный уровень экспрессии NLRP3 необходим для процессов нейрогенеза, регулируя преимущественно ранние этапы: пролиферацию и дифференцировку клеток.

Полученные данные являются новыми, поскольку предыдущие исследования в области нейровоспаления, ассоциированного с NLRP3 инфламмасомой, были в основном проведены на моделях заболеваний животных, сопровождающихся развитием нейровоспаления и изучением роли нокаутирования *Nlrp3* гена при развитии патологии.

Так в 2016 году появилось исследование, согласно которому NLRP3 нокаун является протективным и способен влиять на повреждение процессов пролиферации и дифференцировки, вызванной альфа-синуклеином [113].

В подавляющем большинстве исследований роли нейровоспаления в процессах нейрогенеза доминирующее значение отводится провоспалительным цитокинам и меньше внимания отводится роли инфламмасом в нейрогенных нишах.

Поскольку NLRP3 инфламмосомы принимают непосредственное участие в созревании провоспалительного интерлейкина 1 бета, то рассматривается роль этого цитокина в регуляции нейрогенеза и участии в формировании локального микроокружения в нейрогенных нишах.

Недавно было показано, что воспалительные цитокины, в частности IL-1 β , являются ключевыми модуляторами нейрогенеза [454].

Последние исследования показали, что нейрогенез модулируется воспалительными цитокинами в ответ на активированную иммунную систему. За годы исследований было показано, что воспалительные цитокины играют как положительную, так и отрицательную роль в пролиферации и дифференцировке нейронов. Следовательно, это укрепляет представление о том, что воспаление участвует в молекулярных и клеточных механизмах, связанных со сложными когнитивными процессами, и, следовательно, что изменения в мозгово-иммунной коммуникации имеют отношение к развитию нервно-психических расстройств [54].

Цитокины могут играть существенную роль в головном мозге: с одной стороны, они могут обеспечивать иммунную защиту, очищение от мертвых и поврежденных нейронов и, с другой стороны, они могут оказывать

определенные негативные воздействия на нейрогенные ниши и НСК, приводящие к гибели нейронов [54].

Хотя некоторые исследования были сосредоточены на противовоспалительных цитокинах, в отношении их либо положительного или отрицательного влияния на нейрогенез, по-прежнему существует необходимость в дальнейшем понимании их вклада в модуляцию клеточной дифференцировки и выживания [54].

Цитокины играют центральную роль в различных функциях ЦНС. Появляются свидетельства того, что во время воспалительного ответа цитокины воздействуют на нейрогенную нишу и регулируют пролиферацию НСК и нейрогенез, особенно в контексте психиатрических и нейродегенеративных заболеваний [125]. Действительно, гиперэкспрессия провоспалительных цитокинов была связана с несколькими психоневрологическими расстройствами, такими как депрессия, и нейродегенеративные заболевания, в том числе болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [272]. Точно так же в головном мозге пациентов с БА была выявлена повышенная выработка интерлейкина 1, вместе с повышенным истощением пула НСК в отдельных нейрогенных областях, в том числе в субвентрикулярной зоне [54]. Несколько путей, которыми цитокины могут вызывать повреждение головного при БА были предложены, среди которых доминирующее значение имеет роль цитокинов в опосредовании воспалительного ответа, главным образом, через глиальную активацию, которая впоследствии приводит к нейродегенерации клеток [390].

Так согласно данным литературы IL-1 α увеличивает нейрогенез *in vitro*, тогда как в большинстве исследований IL-1 β уменьшает пролиферацию НСК и нейрональную дифференцировку и усиливает глиогенез. Это отличается от исследований *in vivo*, где данные свидетельствуют что и IL-1 α , и IL-1 β оказывают ингибирующее влияние на нейрогенез в гиппокампе [50]. Тем не менее, это несоответствие между исследованиями *in vitro* и *in vivo* может быть частично объяснено различными клетками мозга, используемыми в *in vitro*,

поскольку IL-1 α оказывает стимулирующее действие на клетки среднего мозга (в единственном исследовании *in vitro*), тогда как IL-1 β стимулирующие эффекты в клетках среднего мозга, но ингибирующие эффекты в клетках гиппокампа [54].

IL-1 β уменьшает пролиферацию и нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа головного мозга, тогда как совместное лечение антагонистом рецептора IL-1 (ra) предотвращало отрицательное влияние IL-1 β на пролиферацию клеток [339]. Еще одно исследование показало, что IL-1 β уменьшал пролиферацию, а также апоптоз НСК у взрослых крыс [54].

Полученные в данном диссертационном исследовании результаты о новой роли NLRP3 инфламмасом в регуляции основных процессов нейрогенеза, вероятно объясняются двойной ролью данного типа инфламмасом в головном мозге: базальный уровень (физиологический) NLRP3 обеспечивает необходимую микросреду для пролиферации НСК и их дифференцировки в нейроны, тогда как супрафизиологические концентрации (как, например, после инъекции бета-амилоида) имеют противоположный эффект. Данные события находят свое отражение в поведении животных.

Подобный эффект наблюдали при изучении провоспалительного цитокина IL1beta, который созревает после сборки мультипротеинового NLRP3 комплекса. Большинство исследований показывают, что патофизиологические уровни провоспалительного цитокина интерлейкина-1 оказывают вредное влияние на формирование памяти. Тем не менее, последние данные свидетельствуют о том, что IL-1 может быть необходим для нормальной физиологической регуляции гиппокампально-зависимой памяти. Кроме того, было продемонстрировано ранее, что IL-1 играет критическую роль не только в формировании гиппокамп-зависимой памяти, но и в нормальном развитии гиппокампа. Было доказано, что небольшое увеличение уровней IL-1 в мозге может улучшить память, тогда как любое отклонение от физиологического диапазона, либо из-за чрезмерного повышения уровней IL-

1, либо из-за блокады передачи сигналов IL-1, приводит к в ослабленной памяти [145].

Таким образом, суммируя вышеизложенное можно заключить, что базальные уровни экспрессии NLRP3 как составного компонента особой микросреды в гиппокампе необходимы нормального нейrogenеза и процессов запоминания.

В отсутствии NLRP3 инфламмасом происходит снижение не только основных маркеров нейrogenеза, отображающих интенсивность данного процесса, но и маркера ангиогенеза VEGF.

Недавнее исследование убедительно продемонстрировало нейrogenную роль микроглии в нейrogenезе гиппокампа у взрослых в дополнение к их установленной роли в опосредовании развития воспаления и очистке от мертвых нейробластов и нейронов. Было показано, что снижение микроглиальных клеток в зубчатой извилине, где находятся нейрональные стволовые клетки, является достаточным, чтобы препятствовать общему нейrogenезу гиппокампа из-за снижения выживаемости новообразованных нейробластов. Кроме того, в данном исследовании было показано, что трансгенная индукция мощного нейrogenного фактора VEGF вызывала надежную экспансию и активацию микроглиальных клеток в зубчатой извилине. Примечательным в данном исследовании было то, что даже частичное снижение уровня микроглии в процессе VEGF-индуцированного нейrogenеза привело к снижению количества вновь образованных нейробластов до базального уровня. Таким образом, взятые вместе, результаты раскрывают врожденные уникальные свойства микроглии зубчатой извилины, поддерживающие как базальный, так и VEGF-индуцированный нейrogenез гиппокампа у взрослых. doi: 10.1002/glia.23505.

По аналогии с клетками микроглии, а также продуцируемыми ими факторами, астроциты и отсутствие экспрессии в них провоспалительных факторов, в том числе и инфламмасом, могут приводить к нарушенному процессу нейrogenеза.

Еще одним интересным наблюдением нашего исследования является изменение морфологии астроцитов у нокаутированных по гену *Nlrp3* мышей. Недавно было продемонстрировано, что активация toll-подобных рецепторов в астроцитах оказывает просинаптогенное действие. Эти результаты подтверждают важную функцию астроцитов во время постнатального развития и раскрывают путь toll-рецептора 4 типа в астроцитах, регулирующих постнатальное развитие возбуждающего синапса [361]. Логично предположить, что NLRP3 также играет ключевую роль в синаптической передаче, подобно toll-like рецепторам 4, которые также необходимы для индукции врожденных иммунных реакций.

Таким образом, настоящее исследование продемонстрировало новые данные о том, что базовый уровень NLRP3-воспаления в головном мозге мышей необходим для обусловленной кондиционированием пластичности в вентральном гиппокампе, в то время как делеция *Nlrp3* нарушает синаптическую трансдукцию и вызывает тревожное поведение и затруднение в приобретении памяти. Это предполагает, что «слабовыраженное» воспаление, опосредованное экспрессией NLRP3, играет ключевую роль в консолидации памяти.

Полученные в ходе диссертационного исследования данные о снижении числа GFAP+ астроцитов и их измененной морфологии, ассоциированную с отсутствием экспрессии NLRP3 инфламмасом, может приводить к нарушенному нейрогенезу и ангиогенезу.

4.6. Роль NLRP3 в трансинаптической передаче и формировании памяти в норме и при моделировании болезни Альцгеймера. Влияние NLRP3 инфламмасом на метаболизм глюкозы

Влияние бета-амилоида на эмоциональную память и трансинаптическую передачу у *Nlrp3*^{-/-} мышей

В литературе имеются разрозненные данные о роли инфламмасом и провоспалительных интерлейкинов на течение болезни Альцгеймера [392]. Так согласно некоторым данным, мыши, нокаутные по гену *Nlrp3*, скрещенные с мышами с генетической моделью БА APP^{swe}/PS1^{ΔE9} (APP/PS1), полностью защищены от индуцированной амилоидом нейродегенерации. Такое наблюдение объясняется отсутствием продукции зрелых IL1 β или IL18.

Тем не менее, имеются исследования, в которых были получены прямо противоположные результаты: у мышей IL18KO/APP/PS1 наблюдали летальные исходы в возрасте уже 2 месяцев. IL-нокаутные мыши, скрещенные с трансгенными БА мышами, имели более низкий порог при химически индуцированных судорогах и избирательное увеличение экспрессии генов, связанное с повышенной нейрональной активностью. У таких мышей были обнаружены повышенная экспрессия возбудимости синаптических белков, плотность дендритов и базальная возбуждающая синаптическая передача, которые способствуют судорожной активности. Мыши IL18KO/APP/PS1 проявляют повышенную экспрессию возбуждающих, но не ингибирующих синаптических белков [392].

Еще одно исследование показало, что делеция другого типа инфламмасом – Aim2 инфламмасом уменьшает отложение A β и активацию микроглии, но увеличивает экспрессию воспалительных цитокинов у трансгенных мышей с болезнью Альцгеймера. Однако делеция Aim2 не оказывает положительного влияния на пространственную память или экспрессию цитокинов у 5XFAD мышей. Эти результаты показывают, что

агрегация A β и активация микроглии не всегда могут коррелировать с экспрессией воспалительных цитокинов или когнитивной функцией мышей у 5XFAD, в связи с этим остается актуальным изучение роли делеции NLRP3 инфламмасом при болезни Альцгеймера. Данное диссертационное исследование предполагает, что инфламмасомы, вероятно, выполняют разные роли при разных физиологических и патологических событиях. [421]. В данном блоке была экспериментально подтверждена роль NLRP3 инфламмасом в формировании эмоциональной памяти после инъекции бета-олигомеров. Так было показано, что инъекции бета-амилоида не имеют статистически значимого влияния на мышей с нокаутированием гена *Nlrp3*. У таких мышей отмечается типичная кривая обучения, что свидетельствует о сохранности процесса приобретения памяти и об отсутствии негативного влияния бета-олигомеров на гиппокамп головного мозга. Также не было обнаружено негативного влияния на формирование памяти в контекстный и сигнальный дни.

Ранее в исследованиях молекула NLRP3 уже была предложена в качестве молекулы-мишени для терапии БА, однако, оставался до конца неизученным механизм защитного действия [88].

На основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что делеция гена *Nlrp3* обладает протекторным действием в ответ на повреждающее действие олигомеров бета-амилоида 1-42.

В ходе исследования было подтверждено, что у мышей, нокаутированных по гену *Nlrp3* сила возбуждающей синаптической передачи слабее, а также наблюдается более продолжительная элиминация нейромедиатора из синаптической щели.

Полученные данные свидетельствуют об умеренном нарушении транссинаптической передачи нейронов гиппокампа у *Nlrp3*^{-/-}. Эти нарушения связаны с увеличением возбудимости нейронов CA3 зоны гиппокампа. *Nlrp3*^{-/-} генотип обладает протекторным действием на пирамидные нейроны гиппокампа при введении бета-олигомеров в гиппокамп, в виде уменьшения

возбудимости и ускорения высвобождения нейромедиатора до нормальных значений, полученных от животных WT.

На основании проведенных электрофизиологических исследований можно заключить, что базальный (минимальный) уровень интенсивности локального нейровоспаления важен для нормальной синаптической передачи нервного импульса и синаптической пластичности в нейронах гиппокампа. В основе этих процессов лежит регуляция уровня экспрессии лиганд-зависимых и метаболитных рецепторов, как на пре-, так и на постсинаптической мембране. Эти процессы модулируются бета-амилоидом.

Влияние NLRP3 инфламмасом на метаболизм глюкозы

Церебральному энергетическому метаболизму при болезни Альцгеймера в последнее время уделяется все больше внимания. В данном эксперименте был исследован гиппокампальный метаболизм лактата при моделировании БА у мышей дикого типа и у *Nlrp3^{-/-}*. При определении уровня лактата в гиппокампе головного мозга мышей было определено, что моделирование болезни Альцгеймера посредством введения бета-олигомеров приводит к снижению уровня лактата у контрольных мышей, тем не менее показано, что инъекция A β 1-42 нокаутным мышам не приводит к изменению концентрации лактата в гомогенатах гиппокампа.

В литературе до сих пор остаются разрозненные данные о концентрации лактата в гиппокампе при нейродегенерации. Так было продемонстрировано ранее, что, несмотря на прогрессирующее снижение уровня лактата во фронтальной коре с возрастом у C57BL/6 мышей, в гиппокампе уровень лактата не снижается [382].

Имеются также данные о повышении уровня лактата в гиппокампе мышей с моделью болезни Альцгеймера, что объясняют усилением поглощения глюкозы и нейрональной активностью. Предполагают, что перенос лактата скомпрометирован в головном мозге или отрицательно влияет на осаждение A β . 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 [326].

Одним очевидным объяснением наблюдаемого снижения лактата может быть потеря нейронов, которая типична для прогрессирования БА [382]. Тем не менее, во многих исследованиях было показано снижение уровня метаболизма глюкозы в мозге до начала заболевания и потери клеток. Такие наблюдения были получены и у лиц с риском развития БА, например, у носителей APOE4. Поскольку гипометаболизм глюкозы является одним из самых ранних событий, связанных с БА, это предполагает, что такие изменения предшествуют гибели нейронов и могут фактически способствовать развитию и прогрессированию заболевания [280].

Однако следует отметить, что продукция и транспорт лактата между астроцитами и нейронами необходимы для обучения и формирования долговременной памяти [444]. Наши результаты показывают, что контрольные мыши с более высокой концентрацией лактата в гиппокампе демонстрируют большую способность к запоминанию в тесте кондиционирования страха. Эти наблюдения подтверждают, что производство лактата в гиппокампе является ключевым фактором функции памяти. Ранее было показано, что лактат усиливает NMDA-опосредованную сигнализацию путем модуляции окислительно-восстановительного состояния в нейронах, а также путем индуцирования экспрессии генов, связанных с синаптической пластичностью [369]. Имеются данные, что лактат наряду с другими глиотрансмиттерами необходим для консолидации памяти [369].

Идея о том, что лактат, входящий в активированные синапсы, играет метаболическую роль, в соответствии с высокими потребностями в энергии

мембранных и клеточных процессов, необходимых для долговременной синаптической пластичности и памяти, которые включают, в том числе цитоскелетные ремоделирования, транспорт рецепторов, локальную трансляции мРНК. Помимо своей роли в качестве метаболита и энергетического субстрата, лактат является сигналом для изменения соотношения NADH/NAD⁺ и, следовательно, участвует в окислительно-восстановительном регулировании – механизме важном для пластичности и памяти. Было сообщено, что применение лактата увеличивает внутриклеточный уровень NADH, способствуя экспрессии генов, связанных с пластичностью, и потенцирует передачу сигналов через NMDA-рецепторы [382].

Также последние исследования с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания и вестерн-блоттинг-анализа для выявления изменений содержания лактата и переносчиков лактата (MCT1, MCT2, MCT4) в мозге мышей APP/PS1 с амилоидными бета-бляшками, продемонстрировало уменьшенное количество нейронов и олигодендроцитов и увеличенное количество астроцитов. Было обнаружено, что содержание лактата и экспрессия церебральных MCT1, MCT2 и MCT4 снижено у мышей APP/PS1. В частности, лактатдегидрогеназа А (LDHA) и В (LDHB) были снижены в нейронах с повышенным соотношением LDHA и LDHB. Это исследование показало, что уменьшение содержания церебрального лактата и переносчиков лактата может привести к блокировке транспорта лактата из глии в нейроны, что приводит к дефициту лактата в нейронах. Увеличение соотношения нейронов LDHA и LDHB может представлять собой реакцию нейронов на дефицит лактата, хотя и не может восполнить дефицит энергии в нейронах [382].

Таким образом, снижение лактата в гиппокампе, наблюдаемое в группах контрольных мышей с введением бета-олигомеров и в группе мышей, нокаутных по гену *Nlrp3*, подтверждает его ключевую роль в процессах запоминания, что сопровождается ухудшением выполнения поведенческих

тестов. Кроме того, полученные данные впервые убедительно демонстрируют, что *Nlrp3*^{-/-} фенотип сопровождается снижением продукции лактата в гиппокампе, что также находит свое отражение в поведении мышей. Но, вместе с тем, у таких мышей после введения бета-олигомеров не наблюдается изменения в экспрессии лактата, что позволяет заключить о индифферентности нокаутирования *Nlrp3* гена по отношению к моделированию нейродегенерации (Рисунок 131).

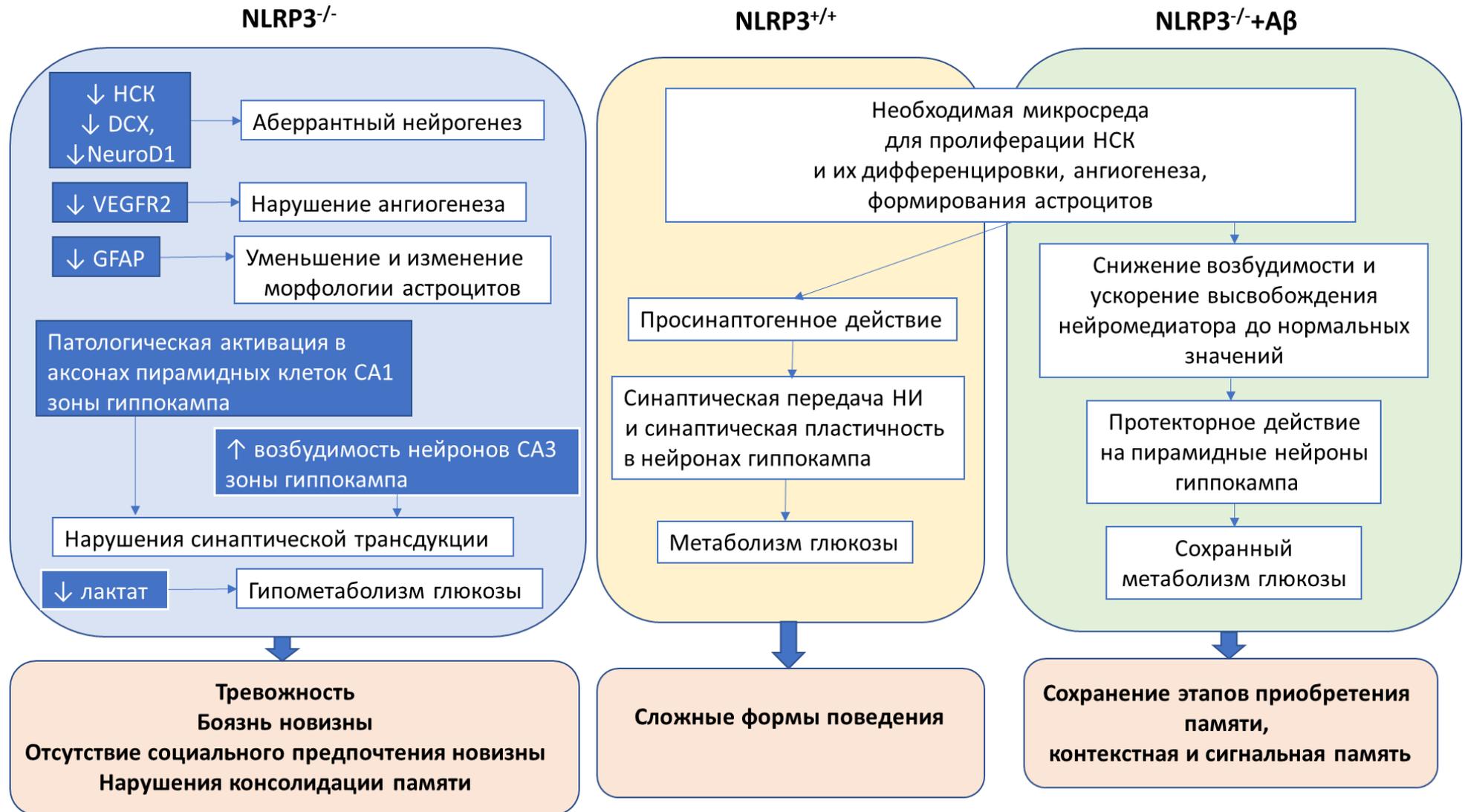


Рисунок 131 – Роль NLRP3 в формировании локального микроокружения в нейрогенной нише в норме и при патологии.

4.7. Роль эндогенного газового трансммиттера H₂S, продуцируемого эндотелиоцитами, в процессах раннего нейрогенеза, формировании клеток астроглиальной природы и экспрессии NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина. Влияние делеции гена *CSE* на когнитивные функции и тревожность

Продукция газовых трансммиттеров клетками млекопитающих привлекает все больше внимания в последнее десятилетие. Сероводород в настоящее время считается третьим газовым трансммиттером после оксида азота и окиси углерода, который способствует регуляции сердечно-сосудистой системы, системного и легочного артериального давления и вазомоторной деятельности, контролирует воспаление и ангиогенез. Принято считать, что распределение ферментов CBS и CSE в ткани млекопитающих разные в разных органах и тканях [222].

Некоторые авторы считают, что CSE играет важную роль в продукции H₂S только в сердечно-сосудистой системе, тогда как CBS отвечает за производство H₂S в головном мозге [409] активированными астроцитами из-за сдвига внутриклеточного pH, необходимого для высвобождения H₂S из связанной серы. Тем не менее, именно CSE, но не CBS, был обнаружен в мозговых микрососудах, тогда как экспрессия CBS была выявлена в паренхиме головного мозга. Еще в одном исследовании было установлено, что путь MST в основном способствует генерации H₂S в мозге и что этот путь регулируется внутриклеточным кальцием (Ca²⁺) в зависимости от его концентрации [215].

Кроме того, на базе Немецкого института питания (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, г. Потсдам, Германия, под руководством Ш.Кремер) мною было проведено поведенческое фенотипирование *CSE*^{-/-} мышей. Эти данные позволяют сделать заключение, что у животных, не экспрессирующих ген *CSE*, происходит нарушение социальной памяти, а также отмечается развитие тревожного типа поведения. Таким образом, можно заключить, что

не только CBS и MCT играют важную роль в функционировании нервной системы и продукции H_2S , но и CSE.

Как уже отмечалось, в литературе есть лишь единичные сведения о том, что H_2S оказывает влияние на стволовые клетки, однако остается до сих пор неизвестным, как меняется продукция эндогенного H_2S на ранних этапах нейрогенеза по мере «созревания» нейрональных стволовых клеток [246].

В связи с этим актуальным является изучение роли фермента CSE, участвующего в синтезе эндогенного сероводорода в головном мозге в клетках на ранних этапах нейрогенеза в пределах нейрогенных ниш.

В данном исследовании было выявлено, что у мышей, нокаутных по гену *CSE*, наблюдается снижение числа мультипотентных стволовых клеток, а также активированных стволовых клеток, которые активно пролиферируют. Таким образом, можно заключить, что CSE и продуцируемый им H_2S необходим для ранних процессов нейрогенеза, что проявляется снижением числа НСК в группе мышей с нокаутированием гена *CSE*. Следовательно, фермент CSE необходим для образования и пролиферации НСК, а поэтому играет важную роль в формировании микроокружения в нейрогенных нишах за счет продуцируемого в катализируемой им реакции сероводорода. Поэтому газовый трансмиттер H_2S можно рассматривать как потенциальную молекулу, участвующую в формировании микроокружения в нейрогенных нишах.

Роль H_2S в центральной нервной системе привлекает в последние несколько лет много внимания [345]. Имеются данные, что H_2S защищает нервные клетки от окислительного стресса, сохраняет фоторецепторные клетки в сетчатке при индуцированной светом дегенерации, регулирует стресс эндоплазматического ретикулума. Нейромодуляция и нейропротекция нейронов являются общей чертой H_2S (и ферменты, участвующие в его продукции, оказывают влияние на различные патологии, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, церебральная ишемия и болезни Хантингтона. Кроме того, в последнее время обсуждается

возможное участие H_2S в развитие демиелизирующих расстройств и дегенеративных нарушений периферических нервов [214].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что газ H_2S может выступать в качестве мощного нейропротективного агента. H_2S защищает клетки от цитотоксичности, вызванной бета-амилоидом. H_2S также защищает нейроны от гипоксии или вызванной окислительным стрессом травмы. Ключевыми механизмами, лежащими в основе нейропротекции H_2S , являются его антиоксидантные и противовоспалительные эффекты [258].

В данном исследовании подтверждена новая роль H_2S и фермента CSE в образовании и поддержании пула активированных НСК, а следовательно, на ранних этапах нейрогенеза.

Астроциты и микроглия играют важную роль в регуляции уровня рН мозга, уровней нейротрансмиттеров и нейрональной возбудимости, ассоциированы с прогрессированием нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, а также играют важнейшую роль в окружении. H_2S вызывает Ca^{2+} волны в астроцитах, что индуцирует Ca^{2+} ток через каналы в плазматической мембране, а также обратимо увеличивает уровни Ca^{2+} в микроглии в дозо-зависимой манере. В дополнение к регуляции гомеостаза Ca^{2+} , H_2S может также участвовать в долгосрочной потенциации (LTP) и модуляции различных нейротрансмиттеров. H_2S облегчает LTP в гиппокампа через активацию N-метил-D-аспартатных (NMDA) рецепторов, а также фосфорилирование этих рецепторов протеинкиназой A (PKA) и изменение внутриклеточного уровня Ca^{2+} в астроцитах и срезах гиппокампа. На основе приведенных данных, было предположено, что H_2S действует как синаптический модулятор, реализуя свой эффект по все видимости через астроциты [214]. Весьма привлекательным остается изучение роли экспрессии CSE фермента, участвующего в продукции H_2S в клетках, которые формируют микроокружение в нейрогенной нише, а именно в астроцитах [190]. При этом не было выявлено изменений в экспрессии GFAP+ астроцитах у мышей с делецией гена CSE.

Экспрессия маркеров воспаления

Хорошо известно, что газовый нейротрансмиттер H_2S проявляет противовоспалительное действие, но нарушение регуляции образования этих газообразных передатчиков в местах воспаления может способствовать дегенеративным изменениям. H_2S , продуцируемый CBS, локализуется в линии астроглиальных клеток и активируется в реактивных астроцитах. Тем не менее, мало что известно о предполагаемой роли H_2S , продуцируемом CSE, в периваскулярном воспалении несмотря на то, что это газообразное вещество может проявлять нейрозащитные эффекты из-за противовоспалительной активности [214], а следовательно, может быть использовано при терапии нейродегенеративных расстройств.

В исследовании была определена экспрессия маркеров воспаления: NLRP3 инфламмасом и провоспалительного интерлейкина $IL1\beta$, продукта активности NLRP3 инфламмасом. Было выявлено, что у $CSE^{-/-}$ мышей наблюдается значительное увеличение числа клеток, одновременно локализующих NLRP3/ $IL1\beta$. В связи с этим справедливо заметить, что делеция гена CSE приводит к увеличению экспрессии маркеров воспаления, а значит нормальный физиологический уровень экспрессии H_2S в эндотелиоцитах головного мозга обладает противовоспалительными свойствами. Справедливо заключить, что молекула CSE может быть рассмотрена как потенциальная терапевтическая мишень при нейровоспалении (Рисунок 132).

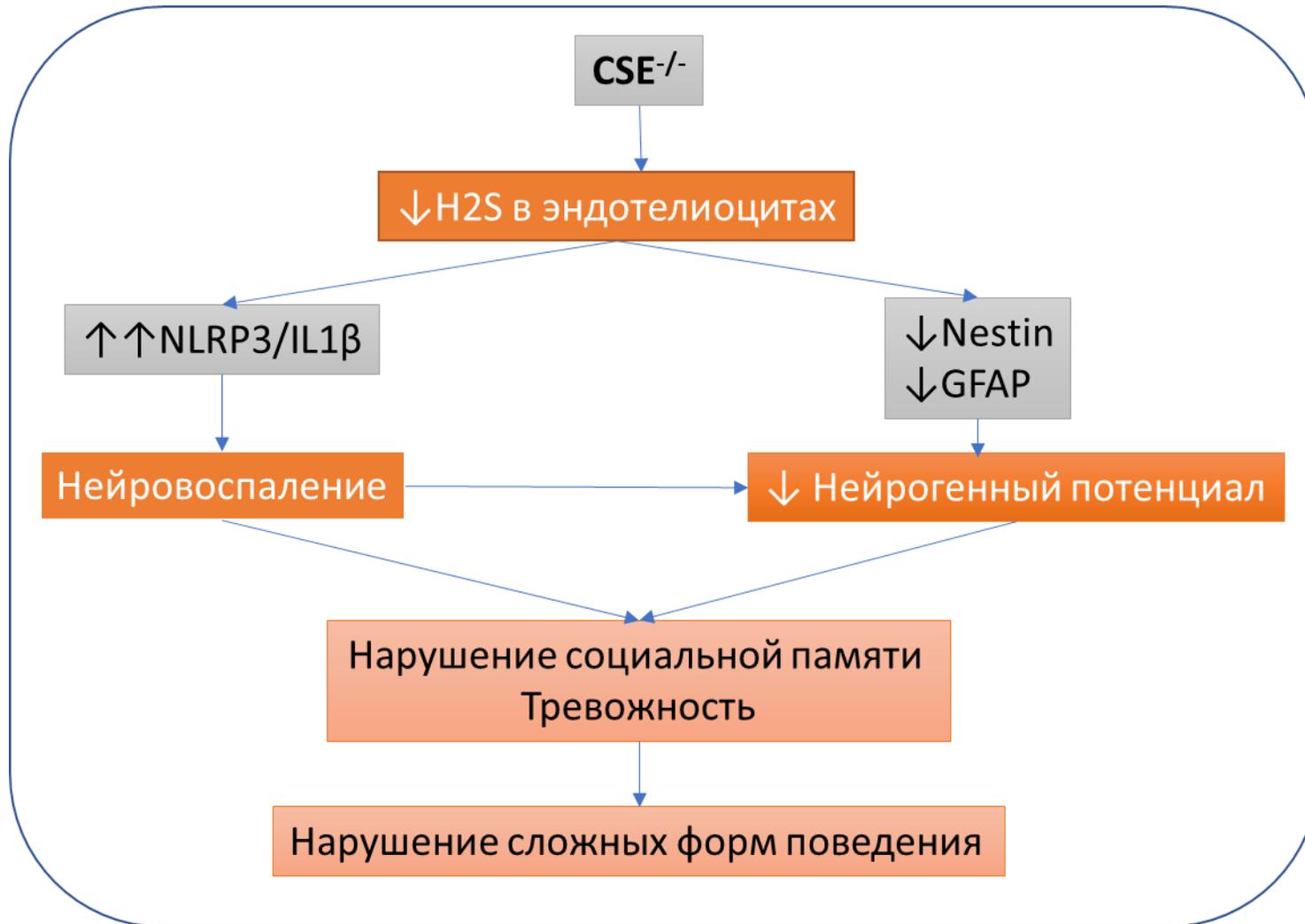


Рисунок 132 – Роль CSE/H₂S в нейрогенезе и поведении.

4.8. Роль рецепторов конечных продуктов гликирования белков (RAGE) в процессах нейрогенеза

Как было показано в данном исследовании RAGE, экспрессируемый в микрососудах мозга, участвует в развитии болезни Альцгеймера, стимулируя нейроваскулярное воспаление. Однако неизвестно, каким образом делеция данного гена может влиять на нейрогенез в головном мозге [267].

Интересно, что RAGE экспрессируется мечеными бромодезоксиуридином (BrdU) клетками в субгранулярной зоне взрослых крыс после хронического введения флуоксетина, препарата, способствующего нейрогенезу в гиппокампе. Кроме того, интрацеребровентрикулярная инфузия лиганда RAGE S100B усиливает нейрогенез гиппокампа и, параллельно, улучшает когнитивные функции после черепно-мозговой травмы. В целом, эти результаты предполагают, что RAGE может потенциально регулировать пронеурогенный ответ на повреждение головного мозга в области гиппокампа. Эта гипотеза подтверждается предыдущими данными, демонстрирующими, что активация RAGE/NF-κB способствует как пролиферации, так и нейрональной дифференцировке взрослых нейронных клеток-предшественников в субвентрикулярной зоне *in vitro* [267].

Несколько исследований также подтвердили, что HMGB1 и S100B, идентифицированные как лиганды RAGE в центральной нервной системе, вовлечены в дифференцировку нейронов. RAGE участвует в дифференцировке эмбрионов и взрослых нейронов, в регенерации периферических нервов и в разрастании / удлинении нейритов [316].

В данном исследовании доказано, что у мышей, с делецией *RAGE* наблюдается снижение пролиферации мультипотентных стволовых клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины, что может приводить к нарушению последующих этапов нейрогенеза.

Также было впервые описано, что делеция гена *RAGE* приводит к снижению экспрессии нейробластов, а следовательно, это может привести к патологии зрелых нейронов.

Таким образом, *RAGE* является важным регулятором локального микроокружения нейрогенных ниш.

4.9. Пролиферация нейрональных предшественников при модуляции активности клеток астроглии в микроокружении нейрогенной ниши в норме и при действии олигомеров бета-амилоида *in vitro*

Концепция «нейрогенной ниши» в биологии стволовых клеток предполагает наличие тесных функциональных взаимосвязей между клетками-предшественниками и их локальным микроокружением, в формирование которого могут вносить вклад некоторые типы клеток посредством межклеточных контактов, внеклеточного матрикса и гуморальных факторов. Направленная модуляция активности клеток, формирующих локальное микроокружение (например, клеток васкулярного скаффолда или клеток глиальной природы) – возможный подход к разработке механизмов управления нейрогенезом *in vitro*, и в перспективе – *in vivo*. В этом контексте, применение оптогенетики является весьма перспективным. До сих пор этот метод применяется в подавляющем большинстве случаев для регуляции активности возбудимых клеток (нейроны, кардиомиоциты), в единичных случаях – для стимуляции астроцитов.

В примененной статической модели нейрогенной ниши *in vitro* были воссозданы основные условия развития нейральных стволовых и прогениторных клеток в гиппокампальной нейрогенной зоне.

Одной из наиболее интересных популяций клеток в составе нейрогенных ниш являются астроциты. Известно, что астроциты, как и другие клетки нейрогенных ниш (эндотелиальные клетки, перициты) усиливают пролиферацию клеток-предшественников и формирование нейросфер. Данные литературы демонстрируют, что в протоколах культивирования клеток-предшественников можно улучшить выживаемость, добавив пока неизвестные факторы, физиологически вносимые астроцитами и эндотелиальными клетками. Последние результаты также подчеркивают сложность организации ниши и различное влияние факторов (цитокины, нейротрансмиттеры, нейропептиды) на развитие нейрональных клеток [102].

В настоящее время установлено, что астроциты эффективно контролируют активность нейронов и синаптическую передачу [303], однако участие астроглии в т.н. глиоваскулярном контроле в пределах нейроваскулярной единицы (НВЕ) головного мозга делает эти клетки привлекательной мишенью для управления другими событиями, подразумевающими взаимодействия, протекающие с участием клеток НВЕ (эндотелиоциты, нейроны, астроциты), в том числе, как было показано недавно в ряде работ, в качестве клеток, трансплантация которых совместно с NSCs, способствует восстановлению дефекта ткани головного мозга после ишемии в эксперименте. С этой точки зрения, нейрогенная ниша сама по себе является уникальной моделью, сочетающей в себе активность т.н. васкулярного скаффолда (собственно НВЕ/ГЭБ) и пула клеток с высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом (НСК/НПК).

Считается, что нейрональная, но не глиальная активность зависит от мембранного потенциала. Таким образом, большинство предыдущих исследований с применением оптогенетических подходов были экспериментально ориентированы главным образом на прямое управление нейрональной активностью и анализа такой манипуляции в функционировании мозга. Сами астроциты не генерируют потенциал действия, но они реагируют на стимуляцию внутриклеточными волнами $[Ca^{2+}]_i$, известными как « Ca^{2+} -возбудимость» [309]. Недавние исследования показали, что активностью астроглиальных клеток можно оптогенетически управлять, что может служить новым инструментом для выяснения роли глиальных клеток в более сложных процессах [71].

Оптогенетические манипуляции с астроцитами впервые были описаны Gourine и коллегами [150]. В исследовании они показали, что стимуляция ChR2-экспрессирующих астроцитов приводит к снижению рН с последующим высвобождением АТФ [150]. Используя эту оптогенетическую систему управления астроцитами, они обнаружили, что АТФ высвобождается из активированных астроцитов в стволе мозга, активирует хеморецепторы

нейронов и регулирует дыхание. Недавнее исследование продемонстрировало, что фотоактивация астроцитов влияет на особенности нейронального ответа клеток первичной зрительной коры, важной для сенсорной обработки информации [311]. В одном исследовании световая стимуляция ChR2-экспрессирующих астроцитов зрительной коры усиливала как возбуждающую, так и ингибирующую синаптическую передачу в соседних нейронах. Этот регуляторный эффект астроцитов зависел от метаботропного глутаматного рецептора (mGluR1). Высвобождение глутамата при стимуляции в астроцитах ChR2 было непосредственно продемонстрировано Sasaki и его коллегами [349]. Также было показано, что оптогенетическая стимуляция ChR2 мозжечковых астроцитов, включая глию Бергмана, активировала рецепторы AMPA на клетках Пуркинье и индуцировала длительную депрессию межклеточных синапсов клеток Пуркинье. Совсем недавно было показано, что активация астроцитов в передней части поясной извилины во время нейропатической боли может модулировать бодрствование и сон [424]. Точно также стимуляция ChR2 в астроцитах в заднем гипоталамусе резко индуцировала сон во время активной фазы цикла сна-бодрствования [310], подтверждая участие астроцитов в регуляции сна-бодрствования. Эти исследования показывают, что оптогенетическая стимуляция успешно регулирует активность астроцитов. Следует отметить, что конечный результат активации оптогенетических астроцитов зависит от области мозга. Оптогенетическая стимуляция астроцитов ствола мозга приводит к высвобождению АТФ и регуляции дыхания, тогда как активация Ch2R в астроцитах мозжечка приводит к высвобождению глутамата и нарушению двигательного поведения, модулированного мозжечком [349]. Однако к настоящему времени не было предпринято попыток применить оптогенетический подход для изменения активности астроцитов в составе нейрогенных ниш для направленной модуляции процессов нейрогенеза.

Данные, полученные в ходе данного исследования показывают, что фотоактивированные астроциты непосредственно увеличивают

пролиферативную активность клеток нейрональной природы. Более того, было показано, что бета-амилоид, являясь повреждающим агентом, вызывающим каскад патологических реакций, в том числе и нейровоспаление [95], также влияет на клеточный индекс, а именно снижает пролиферативную активность клеток.

Таким образом, с помощью методов оптогенетической фотостимуляции астроцитов возможно управлять пролиферативным потенциалом в нейрогенной нише.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейровоспаление, индуцированное введением растворимых форм бета-олигомеров амилоида с целью моделирования болезни Альцгеймера сопровождается явлениями реактивного глиоза (активация клеток астроглии, продукция ими NLRP3 инфламмасом, высвобождением HMGB1, IL1 β , увеличением RAGE), гипометаболизмом глюкозы, подавлением процессов нейрогенеза истощением пула НСК, нарушением миграции и пролиферации клеток-предшественников. Эти события сопровождаются усилением экспрессии инфламмасом в клетках нейрогенных ниш и астроцитах. На этом фоне наблюдается повышенная экспрессия маркера инфламмасом на нейрональных клетках-предшественниках, что приводит к последующему неэффективному нейрогенезу в нейрогенных нишах и нарушенной миграции нейрональных предшественников и их последующего созревания в других регионах головного мозга.

Повышение интенсивности маркеров воспаления IL1 β и HMGB1 может свидетельствовать о запуске воспалительного процесса за счет активации инфламмасом, приводя к формированию синаптической и когнитивной дисфункции, и как следствие, способствуя развитию нейродегенерации.

Когнитивная стимуляция способствует процессам нейрогенеза, усиливая дифференцировку клеток по нейрональному пути, а также повышая экспрессию инфламмасом в разных субпопуляциях астроцитов. S100beta-иммунопозитивные протоплазматические астроциты представляют собой субпопуляцию клеток астроглиальной природы, маркирующую указанные нарушения нейрогенеза и особенности экспрессии инфламмасом при нейродегенерации или при обучении.

Поскольку процесс обучения у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера восстанавливает количество CD133+-клеток в нейрогенных нишах, количество нейробластов и миграционную способность клеток-предшественников (не изменяя при этом числа активно пролиферирующих стволовых клеток), логично предположить, что

стимулирование процессом обучения механизмов консолидации памяти у животных с БА, но не резистентных к действию тренировки процессов оперативной (рабочей) памяти, зависят от состояния «резервного» пула нейрональных предшественников и их быстрой мобилизации.

Впервые было обнаружено, что экспрессия NLRP3 инфламмасом в клетках на начальных этапах нейрогенеза, в нейробластах, а также в зрелых нейронах, но не в GFAP+ астроцитах, сопровождает процессы запоминания, тогда как при экспериментальной болезни Альцгеймера эта взаимозависимость не регистрируется. S100beta-иммунопозитивные астроциты, относительное количество которых снижается при обучении, начинают экспрессировать инфламмосомы при запоминании. Интересно, что обучение способствует увеличению экспрессии инфламмасом в нейробластах в нейрогенных нишах и при миграции нейробластов. С учетом наших данных о том, что поддержание пула нейробластов и их способность к эффективной мобилизации актуальны для процесса консолидации памяти, весьма вероятно, что именно консолидация памяти сопровождается экспрессией инфламмасом в клетках нейрогенных ниш (стволовые клетки и клетки-предшественники) за счет участия последних в синаптической трансдукции и синаптической пластичности в нейронах гиппокампа.

Нейродегенерация альцгеймеровского типа приводит к нарушению этого механизма. Важным является то, что процесс запоминания стимулирует экспрессию инфламмасом в мигрирующих клетках. В здоровом мозге экспрессия NLRP3 инфламмасом регистрируется и в стволовых клетках, тогда как при нейродегенерации она доминирует в клетках астроглиальной природы. Экспрессия инфламмасом в s100beta-иммунопозитивных астроцитах в пределах нейрогенных ниш после обучения подтверждает возможную роль этих клеток в механизмах запоминания, существенно нарушающихся при нейродегенерации.

Еще одна роль сигнального пути NLRP3/IL1 β была установлена в ходе данного исследования. Было убедительно показано, что физиологический

уровень экспрессии мультимолекулярного комплекса NLRP3 необходим для поддержания регенеративного потенциала нейрогенной ниши за счет поддержания популяции активированных нейрональных стволовых клеток. Также NLRP3 инфламмосомы участвуют в процессах направленной миграции нейробластов и выживаемости зрелых нейронов.

Полученные в данном диссертационном исследовании результаты о новой роли NLRP3 инфламмосом в регуляции основных процессов нейрогенеза, объясняются двойной ролью данного типа инфламмосом в головном мозге: базальный уровень (физиологический) NLRP3 участвует в обеспечении необходимого локального микроокружения для пролиферации нейрональных стволовых клеток и их дифференцировки в нейроны, тогда как супрафизиологические концентрации при нейровоспалении имеют обратный эффект. Данные события находят свое отражение в поведении животных: процесс запоминания сопровождается экспрессией NLRP3, выключение гена NLRP3 способствует развитию тревожного поведения у мышей. Подобные изменения в поведении обусловлены участием NLRP3 инфламмосом не только в процессах раннего нейрогенеза, направленной миграции и выживаемости нейронов, но и их значительной роли в формировании функционально активных астроцитов и участии в ангиогенезе.

В совокупности это дает основания предполагать, что опосредованные активностью инфламмосом клеточных сигнальных путей в астроцитах и индукция и прогрессию нейрогенеза и миграции клеток-предшественников сопровождают процессы запоминания. Вполне вероятно, что это связано с увеличением экспрессии в астроцитах нейроваскулярной единицы НАД⁺-конвертирующих ферментов CD38 и CD157.

Впервые было показано, что нокаутирование гена *Nlrp3* при инъекции растворимых форм бета-амилоида не приводит к развитию нейровоспаления, оказывая тем самым нейропротекторный эффект. У таких мышей не происходит изменений метаболизма глюкозы, а также трансинаптической передачи импульса. Это позволяет заключить о индифферентности

нокаутирования *Nlrp3* гена по отношению к моделированию нейродегенерации.

Также выявлено, что на ранних стадиях болезни Альцгеймера, в стадии до образования отложений, нейровоспаление сопровождается изменениями сложных форм поведения, которые характеризуются стрессом новизны, тревожным поведением, нарушениями поисковой и исследовательской активности, несмотря на сохраняющийся социальный интерес. Кроме того, несмотря на ранние стадии БА были зафиксированы нарушения в этапах приобретения памяти, консолидации и реконсолидации в раннем и отсроченном периоде. Это сопровождается увеличением экспрессии маркера эндотелиальных клеток, маркируя собой неоваскуляризацию при нейровоспалении, ассоциированном с болезнью Альцгеймера. Тем не менее образованные сосуды характеризует снижение функционально полноценных межклеточных контактов и избыточная экспрессия RAGE, тем самым способствуя усилению нарушений в нейроваскулярной единице и формировании микроокружения. Это в свою очередь может приводить к снижению выделению разнообразных растворимых факторов эндотелиальными клетками и их функциональной неполноценности.

Так, например, в эндотелиоцитах при отсутствии экспрессии в них фермента CSE, отвечающего за образование газового трансммиттера H_2S , отмечается снижение числа мультипотентных стволовых клеток, а также активированных стволовых клеток, которые пролиферируют. Таким образом, фермент CSE, продуцируемый эндотелиоцитами, необходим для образования и пролиферации НСК, а поэтому играет важную роль в формировании микроокружения в нейрогенных нишах за счет продуцируемого в катализируемой им реакции сероводорода. В функционально неполноценных эндотелиоцитах при БА происходит нарушение раннего этапа нейрогенеза в том числе эти нарушения ассоциированы с патологией CSE/ H_2S сигнального пути. Нарушения ранних этапов нейрогенеза сопровождаются поведенческими изменениями у животных при выключении сигнального

каскада CSE/H₂S пути, а именно происходит нарушение социальной памяти, а также отмечается развитие тревожного типа поведения.

Выключение гена *RAGE* сопровождается подавлением процессов нейрогенеза, нарушением пролиферации нейрональных клеток-предшественников и снижением экспрессии нейробластов, что приводит к нарушению последующих этапов нейрогенеза.

Следовательно, рецепторы AGE, наряду с ферментом CSE являются важными регуляторами локального микроокружения нейрогенных ниш, участвуя в непосредственной регуляции нейрогенеза на разных этапах.

Полученные результаты позволяют предложить следующую схему формирования локального микроокружения и нейрогенеза при нейровоспалении, ассоциированном с развитием нейродегенерации (Рисунок 133).

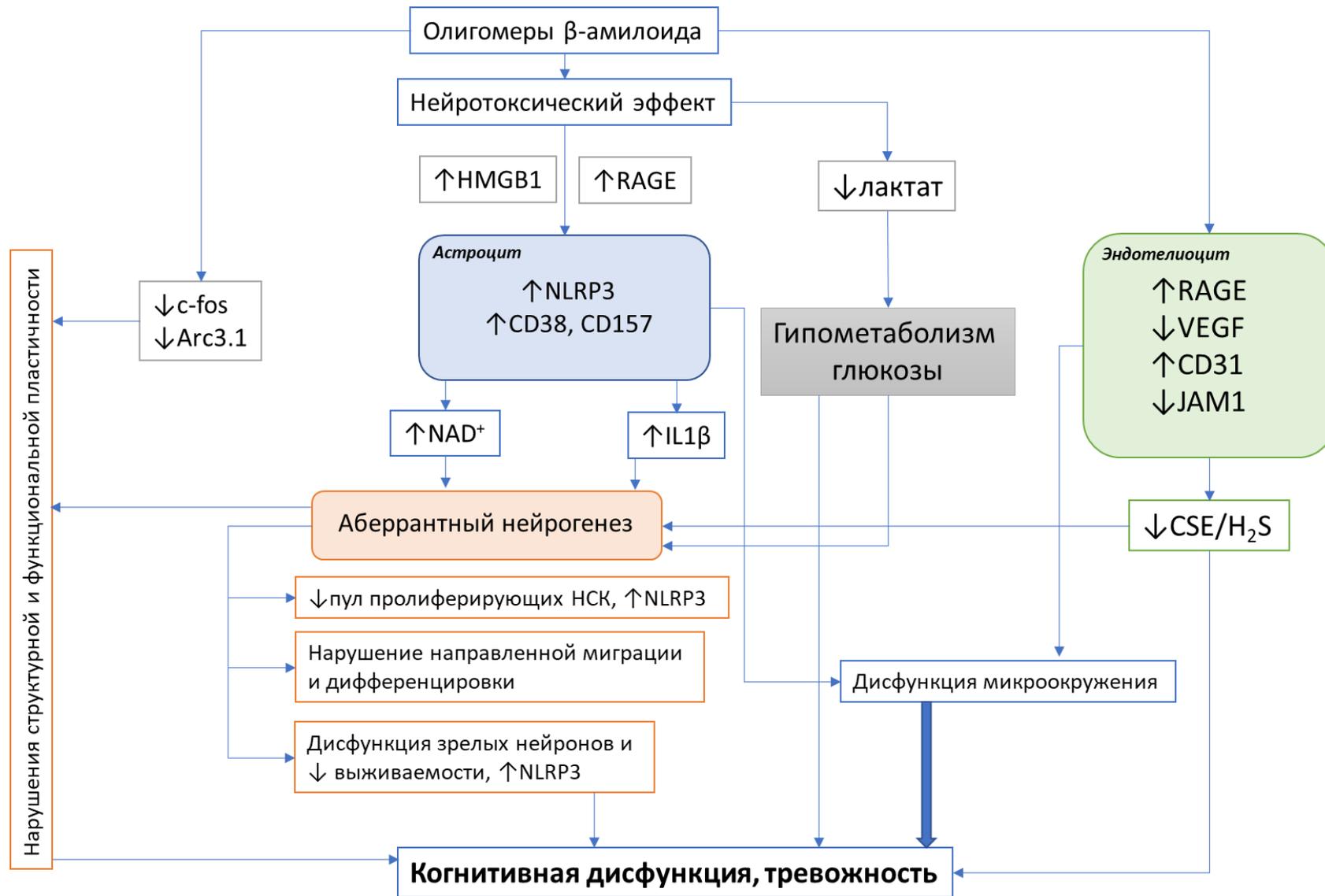


Рисунок 133 – Схема формирования локального микроокружения и нейрогенеза при нейровоспалении, ассоциированном с развитием нейродегенерации

ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментальной болезни Альцгеймера на стадии, предшествующей выраженной аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга, ассоциировано с нарушением формирования ассоциативной ранней и отсроченной памяти, умеренным дефицитом пространственной памяти, развитием тревожности у грызунов. Это сопровождается снижением числа активированных плюрипотентных и мультипотентных стволовых клеток, эктопичной миграцией нейробластов, отсроченным процессом созревания нейронов, увеличением апоптоза и значимым увеличением протоплазматических, но не фиброзных астроцитов в нейрогенных нишах.

2. Когнитивная стимуляция у крыс с нейровоспалением, ассоциированным с нейродегенерацией, не влияет на выживаемость нейронов и их пластичность, но приводит к интенсификации ранних этапов нейрогенеза. У интактных крыс стимулирование когнитивных функций сопровождается увеличением экспрессии NLRP3 инфламмасом в плюрипотентных стволовых клетках и нейробластах, но не в субпопуляциях GFAP⁺ и S100beta⁺ астроцитов. Интрагиппокампальная инъекция бета-амилоида крысам вызывает увеличение экспрессии NLRP3⁺ клеток вне зависимости от длительности исполнения задания в водном лабиринте Морриса.

3. Моделирование нейродегенерации *in vivo* приводит к повышению экспрессии NLRP3 инфламмасом на ранних этапах нейрогенеза: в плюрипотентных стволовых клетках, в нейрональных Nestin⁺ предшественниках в субгранулярной зоне зубчатой извилины, в субвентрикулярной зоне и в ростральном миграционном пути; увеличению экспрессии NLRP3 инфламмасом в зрелых гранулярных нейронах, в GFAP⁺ астроцитах, что сопровождается увеличением экспрессии медиаторов воспаления IL1 β и HMGB1. Патологически измененный нейрогенез при действии растворимых олигомеров бета-амилоида *in vivo* сопровождается разнонаправленной экспрессией НАД⁺ конвертирующих ферментов:

увеличением экспрессии CD38 и CD157 в GFAP+ субпопуляции астроцитов зубчатой извилины гиппокампа, снижением экспрессии CD38 и CD157 в нейронах в пределах нейрогенных ниш.

4. Нейровоспаление, развивающееся на ранних стадиях болезни Альцгеймера в эксперименте, сопровождается увеличением экспрессии рецепторов конечных продуктов гликирования белков RAGE в клетках эндотелиальной природы. Делеция гена *RAGE* приводит к снижению экспрессии маркеров ранних этапов нейрогенеза и этапов приобретения клетками нейрональной судьбы, а именно сопровождается снижением числа мультипотентных стволовых клеток, нарушением последующих этапов нейрогенеза - снижением экспрессии маркеров мигрирующих нейробластов в MAP2 нейронов.

5. Делеция гена *Nlrp3* у мышей сопровождается развитием тревожности, нарушением процессов обучения и формирования памяти, зависимой от гиппокампа и миндалины головного мозга. Для *Nlrp3*-нокаутных мышей характерны нарушения социального поведения. Отсутствие экспрессии NLRP3 в ткани головного мозга приводит к нарушению процессов нейрогенеза: снижение мультипотентных стволовых клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа, числа мигрирующих нейробластов, нарушение нейрональной дифференцировки и снижение выживаемости вновь образованных нейронов, морфологические изменения астроцитов, снижение их лактат-продуцирующей активности, подавление секреции VEGF и нарушение синаптической трансдукции в CA1 и CA3 зонах гиппокампа. При моделировании болезни Альцгеймера на *Nlrp3*^{-/-} животных такие изменения не регистрируются.

6. Развитие церебральной амилоидной ангиопатии в модели хронической нейродегенерации у мышей *in vivo* сопровождается нарушениями процессов ангиогенеза с явлениями неоваскуляризации и формирования сосудов с нарушенной структурной целостностью, что

определяется увеличением экспрессии CD31 и снижением экспрессии JAM1 в клетках церебрального эндотелия.

7. У животных, не экспрессирующих ген сероводород-конвертирующего фермента *CSE*, развиваются нарушения социальной памяти, а также отмечается формирование тревожного типа поведения, снижение числа мультипотентных Nestin⁺стволовых клеток, увеличение экспрессии функционально активных NLRP3 инфламмасом в клетках нейrogenного микроокружения.

8. Активность астроцитов в нейrogenной нише необходима для поддержания пролиферативной активности клеток при нейродегенерации альцгеймеровского типа: в модели нейродегенерации с применением A β 1-42 *in vitro* фотоактивация GFAP-иммунопозитивных астроцитов в гиппокампе обеспечивает частичное восстановление процессов пролиферации стволовых и прогениторных клеток.

9. В патогенезе нейродегенерации, при экспериментальной болезни Альцгеймера, нарушения гиппокампального нейrogenеза связаны с дефектными механизмами формирования локального микроокружения, преимущественно за счет измененной активности астроцитов и клеток эндотелия церебральных микрососудов, что определяется нарушением экспрессии NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина ИЛ-1, НАД⁺-конвертирующих ферментов CD38 и CD157, рецепторов конечных продуктов гликирования белков RAGE, H₂S-генерирующего фермента *CSE*, которые могут быть рассмотрены в качестве мишеней для коррекции механизмов нейропластичности.

Практические рекомендации

1. При экспериментальной болезни Альцгеймера патогенетически обоснованной стратегией коррекции нарушенного нейрогенеза является управление активностью астроцитов и клеток эндотелия церебральных микрососудов головного мозга, имеющее своей целью нормализацию экспрессии NLRP3 инфламмасом, НАД⁺-конвертирующих ферментов CD38, CD157, рецепторов конечных продуктов гликирования белков RAGE и продукции газового трансммиттера H₂S.

2. *Nlrp3*^{-/-} животные являются экспериментальной моделью для изучения механизмов нарушения поведения (тревожность, страх новизны), когнитивной дисфункции (нарушение обучения и памяти), связанных с изменениями нейропластичности в гиппокампе.

3. *RAGE*^{-/-} животные являются экспериментальной моделью для изучения механизмов нарушения нейрогенеза при патологии головного мозга.

4. Оптогенетические протоколы стимуляции клеток астроглиальной природы в составе микроокружения нейрогенных ниш *in vitro* могут быть рекомендованы в качестве базовой стратегии коррекции аберрантного нейрогенеза при нейродегенерации.

Список сокращений

A β – амилоид бета

APP – белок-предшественник амилоида

AVV – аденовирусный вектор

BrdU + BrdU – бромдезоксисуридин

GFAP – глиальный кислый фибриллярный белок

Nestin – маркер стволовых клеток

PCNA – -маркер пролиферирующих клеток

SGZ – субгранулярная зона

SVZ – субвентрикулярная зона

VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИЛ1бета (IL1 β) – интерлейкин 1 бета

НВЕ – нейроваскулярная единица

НКП (NPCs) – нейрональные клетки-предшественники

НСК (NSCs) – нейрональные стволовые клетки

РМС (RMS) – роstralный миграционный путь

Список использованной литературы

1. Александров А.В. [и др.]. Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты / Александров А.В., Воронина Т.А., Бачурин С.О., Гаврилова С.И., Алесенко А.В., [и др.], Москва: Наука, 2010.
2. Аниол В.А., Тишкина А.О., Гуляева Н.В. Нейрогенез и нейровоспаление: роль белков семейства WNT // Нейрохимия. 2016. № 1 (33). С. 5–11.
3. Бондаренко В.М. Воспаление и нейродегенеративные изменения в развитии хронической патологии центральной нервной системы // Медицинский вестник Юга России. 2011. №1. С. 3–7.
4. Евсегнеев Р.А. Болезнь Альцгеймера: прогресс последнего десятилетия // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. 2014. № 3 (17). С. 92–97.
5. Ключник Т.П., Андросова Л.В., Михайлова Н.М. Врождённый иммунитет при болезни Альцгеймера // Патогенез. 2012. № 3 (10). С. 52–53.
6. Козырев К.М., Габуева А.А., Ижиева Д. Б.-А., Джикаева А.М. К вопросу структурно- функциональной оценки отдельных областей головного мозга при болезнях Паркинсона, Альцгеймера и Пика // Вестник новых медицинских технологий. 2017. №. 3 (24) – С. 135–144.
7. Колобов В.В., Сторожева З.И. Особенности применения *in vitro*, *in silico* и трансгенных моделей болезни Альцгеймера // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2014. № 1 (8). С. 34–39.
8. Максимова М.Ю. [и др.] Нейроспецифические белки в оценке состояния ткани мозга при атеротромботическом инсульте (клинико-биохимическое исследование) // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2011. № 5 (3). С. 4–10.
9. Малашенкова И.К. Адаптивный иммунитет, системное воспаление и уровень основных цитокинов у пациентов с болезнью Альцгеймера различных стадией и мягким когнитивным снижением АМ-нестического типа // Аллергология и иммунология. 2018. № 4 (19). С. 206–214.

10. Науменко А.А., Преображенская И.С. Патогенез, диагностика и терапия болезни Альцгеймера // Медицинский совет. 2015. № 5. С. 46–54.
11. Парфенов В.А. Ранняя диагностика и лечение болезни Альцгеймера // Медицинский совет. 2015. № 5. С. 28–33.
12. Петухова Е.О. [и др.]. Стимулирование нейрогенеза в гиппокампе при болезни Альцгеймера // Гены и клетки. 2015. № 4. С. 54–59.
13. Попугаева Е.А., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Роль внутриклеточного кальция в развитии патогенеза болезни Альцгеймера // Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Физико-математические науки. 2014. № 1 (189). С. 79–90.
14. Преображенская И.С., Сницкая Н.С. Некоторые генетические аспекты развития и лечения болезни Альцгеймера // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2014. № 4. С. 51–58.
15. 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.
16. Семина И.И. [и др.]. Динамика развития поведенческих нарушений у трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. № 11 (158). С. 568–571.
17. Угрюмов М.В. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Угрюмов М.В, Москва: Научный мир, 2014. 848 с.
18. Adamczak D.M. [и др.]. The Role of Toll-Like Receptors and Vitamin D in Diabetes Mellitus Type 1 - A Review // Scandinavian Journal of Immunology. 2014. № 2 (80). С. 75–84.
19. Ahmed M. [и др.]. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils // Nature Structural & Molecular Biology. 2010. № 5 (17). С. 561–567.
20. Aimone J.B. [и др.]. Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition // Physiological Reviews. 2014. № 4 (94). С. 991–1026.

21. Akita M. [и др.]. Detection of the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Marker CD133 during Angiogenesis in Three-Dimensional Collagen Gel Culture // *Stem Cells International*. 2013. (2013). С. 1–10.
22. Alasmari F. [и др.]. Neuroinflammatory Cytokines Induce Amyloid Beta Neurotoxicity through Modulating Amyloid Precursor Protein Levels/Metabolism // *BioMed Research International*. 2018. (2018). С. 1–8.
23. Aldana B.I. Microglia-Specific Metabolic Changes in Neurodegeneration // *Journal of Molecular Biology*. 2019. № 9 (431). С. 1830–1842.
24. Ali S.O. [и др.]. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in a rat model of epilepsy: Role of autophagy // *Journal of Advanced Research*. 2019. (18). С. 101–112.
25. Alvarez-Buylla A. [и др.]. The Heterogeneity of Adult Neural Stem Cells and the Emerging Complexity of Their Niche // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2008. № 0 (73). С. 357–365.
26. Amini E. [и др.]. Paradoxical role of PKA inhibitor on amyloid β -induced memory deficit // *Physiology & Behavior*. 2015. (149). С. 76–85.
27. Anacker C., Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood // *Nature Reviews Neuroscience*. 2017. № 6 (18). С. 335–346.
28. 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.
29. Andreu-Agulló C. [и др.]. Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone // *Nature Neuroscience*. 2009. № 12 (12). С. 1514–1523.
30. Antunes M., Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications // *Cognitive Processing*. 2012. № 2 (13). С. 93–110.
31. Apple D.M., Fonseca R.S., Kokovay E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders // *Brain Research*. 2017. (1655). С. 270–276.

32. Ashton R.S. [и др.]. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling // *Nature Neuroscience*. 2012. № 10 (15). С. 1399–1406.
33. Askarova S. [и др.]. Role of A β -receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A2 activation in astrocytes and cerebral endothelial cells // *Neuroscience*. 2011. (199). С. 375–385.
34. Baptista P., Andrade J.P. Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation and Possible Functional and Clinical Correlates // *Frontiers in Neuroanatomy*. 2018. (12). С. 44.
35. Barateiro A. [и др.]. S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis // *Molecular Neurobiology*. 2016. № 6 (53). С. 3976–3991.
36. Bátiz L.F. [и др.]. Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016. (9).
37. Baxter M.G. “I’ve seen it all before”: Explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). // *Behavioral Neuroscience*. 2010. № 5 (124). С. 706–709.
38. Bayraktar O.A. [и др.]. Astrocyte Development and Heterogeneity // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015. № 1 (7). С. a020362.
39. Ben Menachem-Zidon O. [и др.]. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011. № 5 (25). С. 1008–1016.
40. 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.
41. Benveniste H. [и др.]. The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review // *Gerontology*. 2019. № 2 (65). С. 106–119.
42. Bi T.M., Daggett V. The Role of α -sheet in Amyloid Oligomer Aggregation and Toxicity // *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2018. № 3 (91). С. 247–255.

43. Birch A.M., Katsouri L., Sastre M. Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease // *Journal of Neuroinflammation*. 2014. № 1 (11). С. 25.
44. Biron K.E. [и др.]. Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease // *PLoS ONE*. 2011. № 8 (6). С. e23789.
45. Bjornsson C.S. [и др.]. It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche // *Developmental Cell*. 2015. № 4 (32). С. 435–446.
46. Blacher E. [и др.]. Inhibition of glioma progression by a newly discovered CD38 inhibitor: Inhibition of Glioma Progression by K-rhein // *International Journal of Cancer*. 2015. № 6 (136). С. 1422–1433.
47. Blacher E. [и др.]. Inhibition of glioma progression by a newly discovered CD38 inhibitor: Inhibition of Glioma Progression by K-rhein // *International Journal of Cancer*. 2015. № 6 (136). С. 1422–1433.
48. Blacher E. [и др.]. Alzheimer's disease pathology is attenuated in a CD38-deficient mouse model: CD38 and AD Pathology // *Annals of Neurology*. 2015. № 1 (78). С. 88–103.
49. Bode D.C., Baker M.D., Viles J.H. Ion Channel Formation by Amyloid- β ₄₂ Oligomers but Not Amyloid- β ₄₀ in Cellular Membranes // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. № 4 (292). С. 1404–1413.
50. Boehme M. [и др.]. Impact of indomethacin on neuroinflammation and hippocampal neurogenesis in aged mice // *Neuroscience Letters*. 2014. (572). С. 7–12.
51. Bonaguidi M.A. [и др.]. In Vivo Clonal Analysis Reveals Self-Renewing and Multipotent Adult Neural Stem Cell Characteristics // *Cell*. 2011. № 7 (145). С. 1142–1155.
52. Bonaguidi M.A. [и др.]. Diversity of Neural Precursors in the Adult Mammalian Brain // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016. № 4 (8). С. a018838.

53. Bond A.M., Ming G., Song H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later // *Cell Stem Cell*. 2015. № 4 (17). С. 385–395.
54. Borsini A. [и др.]. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis // *Trends in Neurosciences*. 2015. № 3 (38). С. 145–157.
55. Bostancılioğlu M. An update on the interactions between Alzheimer's disease, autophagy and inflammation // *Gene*. 2019. (705). С. 157–166.
56. Botton P.H. [и др.]. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice // *Behavioural Brain Research*. 2010. № 2 (214). С. 254–259.
57. Breyhan H. [и др.]. APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy // *Acta Neuropathologica*. 2009. № 6 (117). С. 677–685.
58. Brites D., Vaz A.R. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014. (8).
59. Bruzzone S. [и др.]. Glutamate-mediated overexpression of CD38 in astrocytes cultured with neurones // *Journal of Neurochemistry*. 2004. № 1 (89). С. 264–272.
60. Burlock B. [и др.]. The Role of CD38 on the Function of Regulatory B Cells in a Murine Model of Lupus // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. № 10 (19). С. 2906.
61. Cao X. [и др.]. Astrocytic Adenosine 5'-Triphosphate Release Regulates the Proliferation of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus: Mitogenic Effect of Astrocytic ATP in Adult SGZ // *STEM CELLS*. 2013. № 8 (31). С. 1633–1643.
62. Casares-Crespo L. [и др.]. On the Role of Basal Autophagy in Adult Neural Stem Cells and Neurogenesis // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018. (12). С. 339.
63. Catavero C., Bao H., Song J. Neural mechanisms underlying GABAergic regulation of adult hippocampal neurogenesis // *Cell and Tissue Research*. 2018. № 1 (371). С. 33–46.

64. Ceni C. [и др.]. CD38-dependent ADP-ribosyl cyclase activity in developing and adult mouse brain // *Biochemical Journal*. 2003. № 1 (370). С. 175–183.
65. Chan E.W.L. [и др.]. The NLRP3 inflammasome is involved in the neuroprotective mechanism of neural stem cells against microglia-mediated toxicity in SH-SY5Y cells via the attenuation of tau hyperphosphorylation and amyloidogenesis // *NeuroToxicology*. 2019. (70). С. 91–98.
66. Chaves da Silva P.G. [и др.]. Adult Neurogenesis: Ultrastructure of a Neurogenic Niche and Neurovascular Relationships // *PLoS ONE*. 2012. № 6 (7). С. e39267.
67. Chaves M.L. [и др.]. Predictors of the Progression of Dementia Severity in Brazilian Patients with Alzheimer's Disease and Vascular Dementia // *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2010. (2010). С. 1–7.
68. Chen W. [и др.]. A β 1-42 induces cell damage via RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress in bEnd.3 cells // *Experimental Cell Research*. 2018. № 1 (362). С. 83–89.
69. Chini C.C.S., Tarragó M.G., Chini E.N. NAD and the aging process: Role in life, death and everything in between // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017. (455). С. 62–74.
70. Chiurchiù V., Orlacchio A., Maccarrone M. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. (2016). С. 1–11.
71. Cho W.-H., Barcelon E., Lee S.J. Optogenetic Glia Manipulation: Possibilities and Future Prospects // *Experimental Neurobiology*. 2016. № 5 (25). С. 197.
72. Choe Y., Pleasure S.J., Mira H. Control of Adult Neurogenesis by Short-Range Morphogenic-Signaling Molecules // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016. № 3 (8). С. a018887.

73. Christensen D.Z., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D. Reduced basal and novelty-induced levels of activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) and c-Fos mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of APP^{swe}/PS1 Δ E9 transgenic mice // *Neurochemistry International*. 2013. № 1 (63). С. 54–60.
74. Chuang T.T. Neurogenesis in mouse models of Alzheimer's disease // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2010. № 10 (1802). С. 872–880.
75. Chugh D. [и др.]. Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons // *Experimental Neurology*. 2013. (250). С. 176–188.
76. Chugh D. [и др.]. Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons // *Experimental Neurology*. 2013. (250). С. 176–188.
77. Clarke J.R. [и др.]. Plastic modifications induced by object recognition memory processing // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. № 6 (107). С. 2652–2657.
78. Clayton K.A., Van Enoo A.A., Ikezu T. Alzheimer's Disease: The Role of Microglia in Brain Homeostasis and Proteopathy // *Frontiers in Neuroscience*. 2017. (11). С. 680.
79. Cline E.N. [и др.]. The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018. № s1 (64). С. S567–S610.
80. Conover J.C., Notti R.Q. The neural stem cell niche // *Cell and Tissue Research*. 2008. № 1 (331). С. 211–224.
81. Cotel M.-C. [и др.]. Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice // *Neurobiology of Aging*. 2012. № 1 (33). С. 96–107.
82. Cotel M.-C., Bayer T.A., Wirths O. Age-dependent loss of dentate gyrus granule cells in APP/PS1KI mice // *Brain Research*. 2008. (1222). С. 207–213.
83. Crawley J.N. Behavioral Phenotyping Strategies for Mutant Mice // *Neuron*. 2008. № 6 (57). С. 809–818.

84. Crews L., Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease // *Human Molecular Genetics*. 2010. № R1 (19). C. R12–R20.
85. Cuascut F., Hutton G. Stem Cell-Based Therapies for Multiple Sclerosis: Current Perspectives // *Biomedicines*. 2019. № 2 (7). C. 26.
86. Czeh M., Gressens P., Kaindl A.M. The Yin and Yang of Microglia // *Developmental Neuroscience*. 2011. № 3–4 (33). C. 199–209.
87. Dainikova E.I., Pizova N.V. Cognitive reserve and cognitive impairments: drug and nondrug treatments // *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2014. № 2S (0). C. 62.
88. 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.
89. De Luca C. [и др.]. Neuro-Immune Hemostasis: Homeostasis and Diseases in the Central Nervous System // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018. (12). C. 459.
90. Dean D.N. [и др.]. Strain-specific Fibril Propagation by an A β Dodecamer // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7). C. 40787.
91. DeCarolis N.A., Eisch A.J. Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: A critical evaluation // *Neuropharmacology*. 2010. № 6 (58). C. 884–893.
92. Delgado A.C. [и др.]. Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem Cells through Nitric Oxide Induction // *Neuron*. 2014. № 3 (83). C. 572–585.
93. Deng W., Aimone J.B., Gage F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? // *Nature Reviews Neuroscience*. 2010. № 5 (11). C. 339–350.
94. Deng W., Mayford M., Gage F.H. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice // *eLife*. 2013. (2). C. e00312.

95. Department of Biochemistry, Medical, Pharmaceutical, and Toxicological Chemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia; Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia [и др.]. Early changes in hippocampal neurogenesis induced by soluble Ab1-42 oligomers // *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2018. № 4 (64). С. 326–333.

96. Dong H. [и др.]. Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APP^{sw} (Tg2576) mutant mice by isolation stress // *Neuroscience*. 2004. № 3 (127). С. 601–609.

97. Donovan M.H. [и др.]. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease // *The Journal of Comparative Neurology*. 2006. № 1 (495). С. 70–83.

98. Drew L.J., Fusi S., Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: Why the dentate gyrus? // *Learning & Memory*. 2013. № 12 (20). С. 710–729.

99. Duncan K., Tompary A., Davachi L. Associative Encoding and Retrieval Are Predicted by Functional Connectivity in Distinct Hippocampal Area CA1 Pathways // *Journal of Neuroscience*. 2014. № 34 (34). С. 11188–11198.

100. Dupret D. [и др.]. Spatial Learning Depends on Both the Addition and Removal of New Hippocampal Neurons // *PLoS Biology*. 2007. № 8 (5). С. e214.

101. Dupret D. [и др.]. Spatial Learning Depends on Both the Addition and Removal of New Hippocampal Neurons // *PLoS Biology*. 2007. № 8 (5). С. e214.

102. Ehret F., Vogler S., Kempermann G. A co-culture model of the hippocampal neurogenic niche reveals differential effects of astrocytes, endothelial cells and pericytes on proliferation and differentiation of adult murine precursor cells // *Stem Cell Research*. 2015. № 3 (15). С. 514–521.

103. Ekdahl C.T. Microglial Activation – Tuning and Pruning Adult Neurogenesis // *Frontiers in Pharmacology*. 2012. (3).

104. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues // *Behavioural Brain Research*. 2010. № 2 (215). С. 244–254.
105. Ennaceur A., Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data // *Behavioural Brain Research*. 1988. № 1 (31). С. 47–59.
106. 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.
107. Epp J.R., Chow C., Galea L.A.M. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis // *Frontiers in Neuroscience*. 2013. (7).
108. Erb L. [и др.]. Purinergic signaling in Alzheimer's disease // *Brain Research Bulletin*. 2018. С. S036192301830635X.
109. Erickson M.A., Banks W.A. Blood–Brain Barrier Dysfunction as a Cause and Consequence of Alzheimer's Disease // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013. № 10 (33). С. 1500–1513.
110. Esparza T.J. [и др.]. Soluble amyloid-beta buffering by plaques in Alzheimer disease dementia versus high-pathology controls // *PLOS ONE*. 2018. № 7 (13). С. e0200251.
111. Fan L.-W., Pang Y. Dysregulation of neurogenesis by neuroinflammation: key differences in neurodevelopmental and neurological disorders // *Neural Regeneration Research*. 2017. № 3 (12). С. 366.
112. Fan L.-W., Pang Y. Dysregulation of neurogenesis by neuroinflammation: key differences in neurodevelopmental and neurological disorders // *Neural Regeneration Research*. 2017. № 3 (12). С. 366.
113. Fan Z. [и др.]. MicroRNA-7 Enhances Subventricular Zone Neurogenesis by Inhibiting NLRP3/Caspase-1 Axis in Adult Neural Stem Cells // *Molecular Neurobiology*. 2016. № 10 (53). С. 7057–7069.

114. Fang F. [и др.]. RAGE mediates A β accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease via modulation of β - and γ -secretase activity // *Human Molecular Genetics*. 2018. № 6 (27). С. 1002–1014.
115. 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).
116. Faure A. [и др.]. Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of Aging*. 2011. № 3 (32). С. 407–418.
117. Felix-Ortiz A.C., Tye K.M. Amygdala Inputs to the Ventral Hippocampus Bidirectionally Modulate Social Behavior // *Journal of Neuroscience*. 2014. № 2 (34). С. 586–595.
118. Ferreira S.T., Vieira M.N.N., De Felice F.G. Soluble protein oligomers as emerging toxins in alzheimer's and other amyloid diseases // *IUBMB Life*. 2007. № 4 (59). С. 332–345.
119. Forloni G., Balducci C. Alzheimer's Disease, Oligomers, and Inflammation // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018. № 3 (62). С. 1261–1276.
120. Frank M.G. [и др.]. The redox state of the alarmin HMGB1 is a pivotal factor in neuroinflammatory and microglial priming: A role for the NLRP3 inflammasome // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016. (55). С. 215–224.
121. Frankland P.W., Köhler S., Josselyn S.A. Hippocampal neurogenesis and forgetting // *Trends in Neurosciences*. 2013. № 9 (36). С. 497–503.
122. Fujita K. [и др.]. HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease // *Scientific Reports*. 2016. № 1 (6). С. 31895.
123. Fukami K. [и др.]. Hydrogen Sulfide and T-Type Ca²⁺ Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion // *Pharmacology*. 2017. № 3–4 (99). С. 196–203.

124. Fuster-Matanzo A. [и др.]. Role of Neuroinflammation in Adult Neurogenesis and Alzheimer Disease: Therapeutic Approaches // *Mediators of Inflammation*. 2013. (2013). С. 1–9.
125. Fuster-Matanzo A. [и др.]. Role of Neuroinflammation in Adult Neurogenesis and Alzheimer Disease: Therapeutic Approaches // *Mediators of Inflammation*. 2013. (2013). С. 1–9.
126. Gage F.H. Mammalian neural stem cells // *Science (New York, N.Y.)*. 2000. № 5457 (287). С. 1433–1438.
127. Gao A. [и др.]. Elevation of Hippocampal Neurogenesis Induces a Temporally Graded Pattern of Forgetting of Contextual Fear Memories // *The Journal of Neuroscience*. 2018. № 13 (38). С. 3190–3198.
128. Gao Z. [и др.]. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons // *Nature Neuroscience*. 2009. № 9 (12). С. 1090–1092.
129. Gardner R.S. [и др.]. Differential Arc expression in the hippocampus and striatum during the transition from attentive to automatic navigation on a plus maze // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2016. (131). С. 36–45.
130. Garrido-Urbani S., Bradfield P.F., Imhof B.A. Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs) // *Cell and Tissue Research*. 2014. № 3 (355). С. 701–715.
131. Gebara E. [и др.]. Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging // *Frontiers in Neuroscience*. 2013. (7).
132. Gehring T.V. [и др.]. Detailed classification of swimming paths in the Morris Water Maze: multiple strategies within one trial // *Scientific Reports*. 2015. № 1 (5). С. 14562.
133. Geng Y. [и др.]. Hydrogen Sulfide Inhalation Decreases Early Blood—Brain Barrier Permeability and Brain Edema Induced by Cardiac Arrest and Resuscitation // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015. № 3 (35). С. 494–500.

134. Ghidoni R. [и др.]. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in mild cognitive impairment // *Journal of Neural Transmission*. 2008. № 7 (115). С. 1047–1050.
135. Ginhoux F. [и др.]. Origin and differentiation of microglia // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013. (7).
136. Girard F., Eichenberger S., Celio M.R. Thrombospondin 4 deficiency in mouse impairs neuronal migration in the early postnatal and adult brain // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2014. (61). С. 176–186.
137. 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).
138. Giri M., Lü Y., Zhang M. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status // *Clinical Interventions in Aging*. 2016. С. 665.
139. Giuliani A. [и др.]. Age-Related Changes of the Neurovascular Unit in the Cerebral Cortex of Alzheimer Disease Mouse Models: A Neuroanatomical and Molecular Study // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2019. № 2 (78). С. 101–112.
140. Goldberg J.S., Hirschi K.K. Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche // *Regenerative Medicine*. 2009. № 6 (4). С. 879–897.
141. Golde T.E., Schneider L.S., Koo E.H. Anti-A β Therapeutics in Alzheimer's Disease: The Need for a Paradigm Shift // *Neuron*. 2011. № 2 (69). С. 203–213.
142. Gomez-Arboledas A. [и др.]. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease // *Glia*. 2018. № 3 (66). С. 637–653.
143. Gomez-Gavero M.V. [и др.]. Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. № 4 (109). С. 1317–1322.

144. Gong Y. [и др.]. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. № 18 (100). С. 10417–10422.
145. Goshen I. [и др.]. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes // *Psychoneuroendocrinology*. 2007. № 8–10 (32). С. 1106–1115.
146. Goshen I. [и др.]. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes // *Psychoneuroendocrinology*. 2007. № 8–10 (32). С. 1106–1115.
147. Goshen I., Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2009. № 1 (30). С. 30–45.
148. Götz M., Nakafuku M., Petrik D. Neurogenesis in the Developing and Adult Brain—Similarities and Key Differences // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016. № 7 (8). С. a018853.
149. Gould E. [и др.]. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation // *Nature Neuroscience*. 1999. № 3 (2). С. 260–265.
150. Gourine A.V. [и др.]. Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP // *Science*. 2010. № 5991 (329). С. 571–575.
151. Grabert K. [и др.]. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging // *Nature Neuroscience*. 2016. № 3 (19). С. 504–516.
152. Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Journal of Neuroinflammation*. 2011. № 1 (8). С. 26.
153. Gu Y. [и др.]. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells // *Nature Neuroscience*. 2012. № 12 (15). С. 1700–1706.
154. Gunn A.P. [и др.]. Amyloid- β Peptide A β 3pE-42 Induces Lipid Peroxidation, Membrane Permeabilization, and Calcium Influx in Neurons // *Journal of Biological Chemistry*. 2016. № 12 (291). С. 6134–6145.

155. Guo H. [и др.]. Nickel chloride (NiCl₂)-caused inflammatory responses via activation of NF- κ B pathway and reduction of anti-inflammatory mediator expression in the kidney // *Oncotarget*. 2015. № 30 (6).
156. Haass C. [и др.]. Trafficking and Proteolytic Processing of APP // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 5 (2). С. a006270–a006270.
157. 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.
158. Hammond R. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2004. № 1 (82). С. 26–34.
159. Hammond T.R., Marsh S.E., Stevens B. Immune Signaling in Neurodegeneration // *Immunity*. 2019. № 4 (50). С. 955–974.
160. Harding C., Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1983. № 2 (113). С. 650–658.
161. Hardy J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics // *Science*. 2002. № 5580 (297). С. 353–356.
162. Hatashita S., Wakebe D. Amyloid β deposition and glucose metabolism on the long-term progression of preclinical Alzheimer's disease // *Future Science OA*. 2019. № 3 (5). С. FSO356.
163. Hattori T. [и др.]. CD38 positively regulates postnatal development of astrocytes cell-autonomously and oligodendrocytes non-cell-autonomously: HATTORI et al. // *Glia*. 2017. № 6 (65). С. 974–989.
164. Haughey N.J. [и др.]. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease // *Journal of Neurochemistry*. 2002. № 6 (83). С. 1509–1524.
165. Haughey N.J. [и др.]. Disruption of neurogenesis by amyloid β -peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease: Amyloid- β disrupts neurogenesis // *Journal of Neurochemistry*. 2002. № 6 (83). С. 1509–1524.

166. He J.-T. [и др.]. Role of hydrogen sulfide in cognitive deficits: Evidences and mechanisms // *European Journal of Pharmacology*. 2019. (849). С. 146–153.
167. 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.
168. 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.
169. Heneka M.T. [и др.]. Neuroinflammation in Alzheimer's disease // *The Lancet Neurology*. 2015. № 4 (14). С. 388–405.
170. Heneka M.T. Inflammasome activation and innate immunity in Alzheimer's disease: Innate Immune Activation in AD // *Brain Pathology*. 2017. № 2 (27). С. 220–222.
171. Heneka M.T., McManus R.M., Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease // *Nature Reviews Neuroscience*. 2018. № 10 (19). С. 610–621.
172. Hensley K. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Pathologic Consequences, and Potential for Therapeutic Manipulation // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010. № 1 (21). С. 1–14.
173. Higaki A. [и др.]. Recognition of early stage thigmotaxis in Morris water maze test with convolutional neural network // *PLOS ONE*. 2018. № 5 (13). С. e0197003.
174. Higashida H. [и др.]. Overexpression of human CD38/ADP-ribosyl cyclase enhances acetylcholine-induced Ca²⁺ signalling in rodent NG108-15 neuroblastoma cells // *Neuroscience Research*. 2007. № 3 (57). С. 339–346.
175. Higashida H. [и др.]. An immunohistochemical, enzymatic, and behavioral study of CD157/BST-1 as a neuroregulator // *BMC Neuroscience*. 2017. № 1 (18). С. 35.

176. Hirata H. Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain // *The EMBO Journal*. 2001. № 16 (20). С. 4454–4466.

177. Hoffman H.M., Wanderer A.A. Inflammasome and IL-1 β -Mediated Disorders // *Current Allergy and Asthma Reports*. 2010. № 4 (10). С. 229–235.

178. Hoogland I.C.M. [и др.]. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments // *Journal of Neuroinflammation*. 2015. № 1 (12). С. 114.

179. Horgusluoglu E. [и др.]. Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2017. № 1 (174). С. 93–112.

180. Horowitz A.M., Villeda S.A. Therapeutic potential of systemic brain rejuvenation strategies for neurodegenerative disease // *F1000Research*. 2017. (6). С. 1291.

181. Hu X. [и др.]. Simvastatin inhibits the apoptosis of hippocampal cells in a mouse model of Alzheimer's disease // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017.

182. Huckleberry K.A. [и др.]. Dorsal and ventral hippocampal adult-born neurons contribute to context fear memory // *Neuropsychopharmacology*. 2018. № 12 (43). С. 2487–2496.

183. Hüttenrauch M. [и др.]. Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model // *Translational Psychiatry*. 2016. № 5 (6). С. e800–e800.

184. Ikeda H. [и др.]. Cannabinoid functions in the amygdala contribute to conditioned fear memory in streptozotocin-induced diabetic mice: Interaction with glutamatergic functions // *Experimental Neurology*. 2015. (269). С. 233–241.

185. Paria Decimo [и др.]. Neural Stem Cell Niches in Health and Diseases // *Current Pharmaceutical Design*. 2012. № 13 (18). С. 1755–1783.

186. Ishitsuka K. [и др.]. Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: A role of pericytes for neuroprotection // *Microvascular Research*. 2012. № 3 (83). С. 352–359.
187. Jacobs N.S., Cushman J.D., Fanselow M.S. The accurate measurement of fear memory in Pavlovian conditioning: Resolving the baseline issue // *Journal of Neuroscience Methods*. 2010. № 2 (190). С. 235–239.
188. Jahangiri Z., Gholamnezhad Z., Hosseini M. Neuroprotective effects of exercise in rodent models of memory deficit and Alzheimer's // *Metabolic Brain Disease*. 2019. № 1 (34). С. 21–37.
189. Jang H. [и др.]. Mechanisms for the Insertion of Toxic, Fibril-like β -Amyloid Oligomers into the Membrane // *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2013. № 1 (9). С. 822–833.
190. Ji J. [и др.]. NOSH-NBP, a Novel Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide-Releasing Hybrid, Attenuates Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammatory Injury by Modulating Microglia Polarization // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017. (11). С. 154.
191. Ji J., Maren S. Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear // *Learning & Memory*. 2008. № 4 (15). С. 244–251.
192. Jin K. [и др.]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. № 18 (99). С. 11946–11950.
193. Jin K. [и др.]. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 36 (101). С. 13363–13367.
194. Johansen J.P. [и др.]. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory // *Cell*. 2011. № 3 (147). С. 509–524.
195. Jones M.E. [и др.]. Hippocampal interleukin-1 mediates stress-enhanced fear learning: A potential role for astrocyte-derived interleukin-1 β // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018. (67). С. 355–363.

196. Kabba J.A. [и др.]. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2018. № 1 (38). С. 53–71.
197. Kalinowska A., Losy J. PECAM-1, a key player in neuroinflammation // *European Journal of Neurology*. 2006. № 12 (13). С. 1284–1290.
198. Kamat P.K., Kalani A., Tyagi N. Role of Hydrogen Sulfide in Brain Synaptic Remodeling Elsevier, 2015. 207–229 с.
199. Kandimalla K.K. [и др.]. Mechanism of Neuronal versus Endothelial Cell Uptake of Alzheimer's Disease Amyloid β Protein // *PLoS ONE*. 2009. № 2 (4). С. e4627.
200. Kanemoto S. [и др.]. Proliferation, differentiation and amyloid- β production in neural progenitor cells isolated from TgCRND8 mice // *Neuroscience*. 2014. (261). С. 52–59.
201. Kasai S. [и др.]. Selegiline Ameliorates Depression-Like Behavior in Mice Lacking the CD157/BST1 Gene, a Risk Factor for Parkinson's Disease // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2017. (11). С. 75.
202. Katsimpardi L., Lledo P.-M. Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain // *Current Opinion in Neurobiology*. 2018. (53). С. 131–138.
203. Katsumoto A. [и др.]. Microglia in Alzheimer's Disease: Risk Factors and Inflammation // *Frontiers in Neurology*. 2018. (9). С. 978.
204. 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.
205. 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.
206. Kawauchi T. Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015. (9).

207. Kempermann G. Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015. № 11 (7). C. a018929.
208. Kempermann G., Song H., Gage F.H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015. № 9 (7). C. a018812.
209. Kidana K. [и др.]. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice // *EMBO Molecular Medicine*. 2018. № 3 (10). C. e8184.
210. Kim J.A. [и др.]. Neural stem cell transplantation at critical period improves learning and memory through restoring synaptic impairment in Alzheimer's disease mouse model // *Cell Death & Disease*. 2015. № 6 (6). C. e1789–e1789.
211. Kim Y.N., Kim D.H. Decreased serum angiogenin level in Alzheimer's disease // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012. № 2 (38). C. 116–120.
212. Kimura A. [и др.]. HMGB2 expression is associated with transition from a quiescent to an activated state of adult neural stem cells: HMGB2 Expression in The Adult Hippocampus // *Developmental Dynamics*. 2018. № 1 (247). C. 229–238.
213. Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system // *Neurochemistry International*. 2013. № 5 (63). C. 492–497.
214. Kimura H. Hydrogen Sulfide and Polysulfides as Biological Mediators // *Molecules*. 2014. № 10 (19). C. 16146–16157.
215. Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2015. № 4 (91). C. 131–159.
216. Kimura H. Physiological Roles of Hydrogen Sulfide and Polysulfides под ред. P.K. Moore, M. Whiteman, Cham: Springer International Publishing, 2015. 61–81 с.

217. Kinney J.W. [и др.]. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2018. (4). С. 575–590.

218. Kitamura T. [и др.]. Adult Neurogenesis Modulates the Hippocampus-Dependent Period of Associative Fear Memory // *Cell*. 2009. № 4 (139). С. 814–827.

219. Kitazawa M. [и др.]. Blocking IL-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau Pathology, and Restores Neuronal -Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model // *The Journal of Immunology*. 2011. № 12 (187). С. 6539–6549.

220. Koh S.X.T., Lee J.K.W. S100B as a Marker for Brain Damage and Blood–Brain Barrier Disruption Following Exercise // *Sports Medicine*. 2014. № 3 (44). С. 369–385.

221. Kohman R.A., Rhodes J.S. Neurogenesis, inflammation and behavior // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013. (27). С. 22–32.

222. Köhn C. [и др.]. Differential Effects of Cystathionine- γ -lyase-Dependent Vasodilatory H₂S in Periadventitial Vasoregulation of Rat and Mouse Aortas // *PLoS ONE*. 2012. № 8 (7). С. e41951.

223. Konstantinides N. [и др.]. Phenotypic Convergence: Distinct Transcription Factors Regulate Common Terminal Features // *Cell*. 2018. № 3 (174). С. 622-635.e13.

224. Koyanagi I. [и др.]. Memory consolidation during sleep and adult hippocampal neurogenesis // *Neural Regeneration Research*. 2019. № 1 (14). С. 20.

225. Kremer T. [и др.]. Analysis of Adult Neurogenesis: Evidence for a Prominent “Non-Neurogenic” DCX-Protein Pool in Rodent Brain // *PLoS ONE*. 2013. № 5 (8). С. e59269.

226. Krezymon A. [и др.]. Modifications of Hippocampal Circuits and Early Disruption of Adult Neurogenesis in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease // *PLoS ONE*. 2013. № 9 (8). С. e76497.

227. Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells // *Annual Review of Neuroscience*. 2009. № 1 (32). C. 149–184.
228. Kriegstein A.R., Götz M. Radial glia diversity: A matter of cell fate: Radial Glia Diversity // *Glia*. 2003. № 1 (43). C. 37–43.
229. Kuipers S.D., Schroeder J.E., Trentani A. Changes in hippocampal neurogenesis throughout early development // *Neurobiology of Aging*. 2015. № 1 (36). C. 365–379.
230. Kumar V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation // *Journal of Neuroimmunology*. 2019. (332). C. 16–30.
231. Kumaran D., Maguire E.A. Which computational mechanisms operate in the hippocampus during novelty detection? // *Hippocampus*. 2007. № 9 (17). C. 735–748.
232. Lacor P.N. Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Oligomers // *Journal of Neuroscience*. 2004. № 45 (24). C. 10191–10200.
233. LaFerla F.M., Green K.N. Animal Models of Alzheimer Disease // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 11 (2). C. a006320–a006320.
234. LaLumiere R.T., McGaugh J.L., McIntyre C.K. Emotional Modulation of Learning and Memory: Pharmacological Implications // *Pharmacological Reviews*. 2017. № 3 (69). C. 236–255.
235. Lang Y. [и др.]. Role of Inflammasomes in Neuroimmune and Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review // *Mediators of Inflammation*. 2018. (2018). C. 1–11.
236. Lange S. [и др.]. Brain pericyte plasticity as a potential drug target in CNS repair // *Drug Discovery Today*. 2013. № 9–10 (18). C. 456–463.
237. Lazarov O., Hollands C. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember // *Progress in Neurobiology*. 2016. (138–140). C. 1–18.
238. Leclercq S. [и др.]. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior // *Nature Communications*. 2017. № 1 (8). C. 15062.

239. Lee E.J., Park J.H. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases // *Genomics & Informatics*. 2013. № 4 (11). С. 224.
240. Lee H.-M. [и др.]. Upregulated NLRP3 Inflammasome Activation in Patients With Type 2 Diabetes // *Diabetes*. 2013. № 1 (62). С. 194–204.
241. Leger M. [и др.]. Object recognition test in mice // *Nature Protocols*. 2013. № 12 (8). С. 2531–2537.
242. Lesné S.E. [и др.]. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease // *Brain*. 2013. № 5 (136). С. 1383–1398.
243. Leuner B., Gould E. Structural Plasticity and Hippocampal Function // *Annual Review of Psychology*. 2010. № 1 (61). С. 111–140.
244. Levy A. [и др.]. CD38 deficiency in the tumor microenvironment attenuates glioma progression and modulates features of tumor-associated microglia/macrophages // *Neuro-Oncology*. 2012. № 8 (14). С. 1037–1049.
245. Li B. [и др.]. Failure of Neuronal Maturation in Alzheimer Disease Dentate Gyrus // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2008. № 1 (67). С. 78–84.
246. Li T. [и др.]. Neuroprotective Roles of l-Cysteine in Attenuating Early Brain Injury and Improving Synaptic Density via the CBS/H2S Pathway Following Subarachnoid Hemorrhage in Rats // *Frontiers in Neurology*. 2017. (8). С. 176.
247. Licht T., Keshet E. The vascular niche in adult neurogenesis // *Mechanisms of Development*. 2015. (138). С. 56–62.
248. Lieberwirth C. [и др.]. Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory // *Brain Research*. 2016. (1644). С. 127–140.
249. Lim D.A., Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016. № 5 (8). С. a018820.

250. Lin R., Iacovitti L. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair // *Brain Research*. 2015. (1628). С. 327–342.
251. Lin T.-W. [и др.]. Neurodegeneration in Amygdala Precedes Hippocampus in the APP^{swe}/PS1^{dE9} Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Current Alzheimer Research*. 2015. № 10 (12). С. 951–963.
252. Liu D. [и др.]. Hydrogen sulfide promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells and protects hypoxia-induced decrease in hippocampal neurogenesis // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014. (116). С. 55–63.
253. Liu L., Chan C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease // *Ageing Research Reviews*. 2014. (15). С. 6–15.
254. Llorens-Martín M. Exercising New Neurons to Vanquish Alzheimer Disease // *Brain Plasticity*. 2018. № 1 (4). С. 111–126.
255. Lopatina O. [и др.]. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014. (8).
256. Lopatina O.L. [и др.]. Communication Impairment in Ultrasonic Vocal Repertoire during the Suckling Period of Cd157 Knockout Mice: Transient Improvement by Oxytocin // *Frontiers in Neuroscience*. 2017. (11). С. 266.
257. López-Toledano M.A., Shelanski M.L. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind) // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2007. № 3 (12). С. 229–240.
258. Lu M. [и др.]. The Neuroprotection of Hydrogen Sulfide Against MPTP-Induced Dopaminergic Neuron Degeneration Involves Uncoupling Protein 2 Rather Than ATP-Sensitive Potassium Channels // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012. № 6 (17). С. 849–859.
259. Luchena C. [и др.]. Contribution of Neurons and Glial Cells to Complement-Mediated Synapse Removal during Development, Aging and in Alzheimer's Disease // *Mediators of Inflammation*. 2018. (2018). С. 1–12.

260. Lupo G. [и др.]. Molecular Mechanisms of Neurogenic Aging in the Adult Mouse Subventricular Zone // *Journal of Experimental Neuroscience*. 2019. (13). С. 117906951982904.
261. Lv Z.-Y. [и др.]. Spreading of Pathology in Alzheimer's Disease // *Neurotoxicity Research*. 2017. № 4 (32). С. 707–722.
262. Ma L. [и др.]. Interleukin-1 beta guides the migration of cortical neurons // *Journal of Neuroinflammation*. 2014. № 1 (11). С. 114.
263. Ma Y. [и др.]. CD38 is a key enzyme for the survival of mouse microglial BV2 cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. № 4 (418). С. 714–719.
264. Mamiya N. [и др.]. Brain Region-Specific Gene Expression Activation Required for Reconsolidation and Extinction of Contextual Fear Memory // *Journal of Neuroscience*. 2009. № 2 (29). С. 402–413.
265. Meilandt W.J. [и др.]. Neprilysin Overexpression Inhibits Plaque Formation But Fails to Reduce Pathogenic A Oligomers and Associated Cognitive Deficits in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice // *Journal of Neuroscience*. 2009. № 7 (29). С. 1977–1986.
266. Meißner J.N., Bouter Y., Bayer T.A. Neuron Loss and Behavioral Deficits in the TBA42 Mouse Model Expressing N-Truncated Pyroglutamate Amyloid- β 3–42 // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. № 2 (45). С. 471–482.
267. Meneghini V. [и др.]. High-Mobility Group Box-1 Protein and -Amyloid Oligomers Promote Neuronal Differentiation of Adult Hippocampal Neural Progenitors via Receptor for Advanced Glycation End Products/Nuclear Factor- B Axis: Relevance for Alzheimer's Disease // *Journal of Neuroscience*. 2013. № 14 (33). С. 6047–6059.
268. Merkle F.T., Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development // *Current Opinion in Cell Biology*. 2006. № 6 (18). С. 704–709.
269. Miller M.C. [и др.]. Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease // *Brain Research*. 2008. (1230). С. 273–280.

270. Ming G., Song H. ADULT NEUROGENESIS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM // *Annual Review of Neuroscience*. 2005. № 1 (28). С. 223–250.
271. Mirzadeh Z. [и др.]. Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain // *Cell Stem Cell*. 2008. № 3 (3). С. 265–278.
272. Monson N.L. [и др.]. Elevated CNS Inflammation in Patients with Preclinical Alzheimer's Disease // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014. № 1 (34). С. 30–33.
273. Moore A.H. [и др.]. Sustained expression of interleukin-1 β in mouse hippocampus impairs spatial memory // *Neuroscience*. 2009. № 4 (164). С. 1484–1495.
274. Moore A.H. [и др.]. Sustained expression of interleukin-1beta in mouse hippocampus impairs spatial memory // *Neuroscience*. 2009. № 4 (164). С. 1484–1495.
275. More J. [и др.]. N-Acetylcysteine Prevents the Spatial Memory Deficits and the Redox-Dependent RyR2 Decrease Displayed by an Alzheimer's Disease Rat Model // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018. (10). С. 399.
276. Morimura N. [и др.]. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrfrn2/SALM1*-deficient mice // *Nature Communications*. 2017. (8). С. 15800.
277. Morizawa Y.M. [и др.]. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway // *Nature Communications*. 2017. № 1 (8). С. 28.
278. Morrens J., Van Den Broeck W., Kempermann G. Glial cells in adult neurogenesis // *Glia*. 2012. № 2 (60). С. 159–174.
279. Morshead C.M. [и др.]. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells // *Neuron*. 1994. № 5 (13). С. 1071–1082.

280. Mosconi L., Pupi A., De Leon M.J. Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. № 1 (1147). С. 180–195.

281. Moss J. [и др.]. Fine processes of Nestin-GFP-positive radial glia-like stem cells in the adult dentate gyrus ensheath local synapses and vasculature // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. № 18 (113). С. E2536–E2545.

282. Mucke L., Selkoe D.J. Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 7 (2). С. a006338–a006338.

283. Mun J. [и др.]. Role of hydrogen sulfide in cerebrovascular alteration during aging // *Archives of Pharmacal Research*. 2019. № 5 (42). С. 446–454.

284. Murphy N., Grehan B., Lynch M.A. Glial Uptake of Amyloid Beta Induces NLRP3 Inflammasome Formation via Cathepsin-Dependent Degradation of NLRP10 // *NeuroMolecular Medicine*. 2014. № 1 (16). С. 205–215.

285. Nakashiba T. [и др.]. Hippocampal CA3 Output Is Crucial for Ripple-Associated Reactivation and Consolidation of Memory // *Neuron*. 2009. № 6 (62). С. 781–787.

286. Nakashiba T. [и др.]. Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate Pattern Completion // *Cell*. 2012. № 1 (149). С. 188–201.

287. Naseri N.N. [и др.]. The complexity of tau in Alzheimer's disease // *Neuroscience Letters*. 2019. (705). С. 183–194.

288. Navarro Quiroz E. [и др.]. Cell Signaling in Neuronal Stem Cells // *Cells*. 2018. № 7 (7). С. 75.

289. Nelissen T.P. [и др.]. CD38 is Required for Dendritic Organization in Visual Cortex and Hippocampus // *Neuroscience*. 2018. (372). С. 114–125.

290. Nhan H.S., Chiang K., Koo E.H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes // *Acta Neuropathologica*. 2015. № 1 (129). С. 1–19.

291. Obernier K., Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain // *Development*. 2019. № 4 (146). C. dev156059.
292. Oh I.-H. Microenvironmental targeting of Wnt/ β -catenin signals for hematopoietic stem cell regulation // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010. № 9 (10). C. 1315–1329.
293. Okun E. [и др.]. Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. № 35 (107). C. 15625–15630.
294. Oliveira A.M.M. [и др.]. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory // *Learning & Memory*. 2010. № 3 (17). C. 155–160.
295. Ono K. Alzheimer's disease as oligomeropathy // *Neurochemistry International*. 2018. (119). C. 57–70.
296. Orciani M. [и др.]. CD38 is constitutively expressed in the nucleus of human hematopoietic cells // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008. № 3 (105). C. 905–912.
297. Ott C. [и др.]. Role of advanced glycation end products in cellular signaling // *Redox Biology*. 2014. (2). C. 411–429.
298. Ottoboni L., Merlini A., Martino G. Neural Stem Cell Plasticity: Advantages in Therapy for the Injured Central Nervous System // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017. (5). C. 52.
299. Ozben T., Ozben S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease // *Clinical Biochemistry*. 2019. C. S0009912019301535.
300. Pai C.-S. [и др.]. The Activating Transcription Factor 3 (Atf3) Homozygous Knockout Mice Exhibit Enhanced Conditioned Fear and Down Regulation of Hippocampal GELSOLIN // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018. (11). C. 37.

301. Paillard T., Rolland Y., Souto Barreto P. de Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review // *Journal of Clinical Neurology*. 2015. № 3 (11). С. 212.
302. Pan H. [и др.]. Amyloid β Is Not the Major Factor Accounting for Impaired Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice Overexpressing Amyloid Precursor Protein // *Stem Cell Reports*. 2016. № 4 (7). С. 707–718.
303. Panatier A. [и др.]. Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses // *Cell*. 2011. № 5 (146). С. 785–798.
304. Panthi S. [и др.]. Physiological Importance of Hydrogen Sulfide: Emerging Potent Neuroprotector and Neuromodulator // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. (2016). С. 1–11.
305. Park D. [и др.]. Nestin Is Required for the Proper Self-Renewal of Neural Stem Cells // *STEM CELLS*. 2010. № 12 (28). С. 2162–2171.
306. Parry S., Peeples E. The impact of hypoxic-ischemic brain injury on stem cell mobilization, migration, adhesion, and proliferation // *Neural Regeneration Research*. 2018. № 7 (13). С. 1125.
307. Patel A.B. [и др.]. Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. № 14 (111). С. 5385–5390.
308. 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.
309. Pelluru D. [и др.]. Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57BL/6J mice // *European Journal of Neuroscience*. 2016. № 10 (43). С. 1298–1306.
310. Pelluru D. [и др.]. Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57BL/6J mice // *European Journal of Neuroscience*. 2016. № 10 (43). С. 1298–1306.

311. Perea G. [и др.]. Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo // *Nature Communications*. 2014. № 1 (5).
312. Pérez-Domínguez M., Tovar-y-Romo L.B., Zepeda A. Neuroinflammation and physical exercise as modulators of adult hippocampal neural precursor cell behavior // *Reviews in the Neurosciences*. 2017. № 1 (29). С. 1–20.
313. Pérez-Domínguez M., Tovar-y-Romo L.B., Zepeda A. Neuroinflammation and physical exercise as modulators of adult hippocampal neural precursor cell behavior // *Reviews in the Neurosciences*. 2017. № 1 (29). С. 1–20.
314. Petsophonsakul P. [и др.]. Memory formation orchestrates the wiring of adult-born hippocampal neurons into brain circuits // *Brain Structure and Function*. 2017. № 6 (222). С. 2585–2601.
315. Pino A. [и др.]. New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies // *Biochemical Pharmacology*. 2017. (141). С. 4–22.
316. Piras S. [и др.]. RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. (2016). С. 1–9.
317. Porlan E. [и др.]. Paracrine regulation of neural stem cells in the subependymal zone // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2013. № 1–2 (534). С. 11–19.
318. Poulos A.M. [и др.]. Persistence of fear memory across time requires the basolateral amygdala complex // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. № 28 (106). С. 11737–11741.
319. Pozhilenkova E.A. [и др.]. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain // *Reviews in the Neurosciences*. 2017. № 4 (28).
320. Presta I. [и др.]. Innate Immunity Cells and the Neurovascular Unit // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. № 12 (19). С. 3856.

321. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review // *European Journal of Pharmacology*. 2003. № 1–3 (463). С. 3–33.

322. Qi Y. [и др.]. NLRP3-dependent synaptic plasticity deficit in an Alzheimer's disease amyloidosis model in vivo // *Neurobiology of Disease*. 2018. (114). С. 24–30.

323. Qin W. [и др.]. Elevated Plasma Angiogenesis Factors in Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. № 1 (45). С. 245–252.

324. Redwine J.M. [и др.]. Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: A magnetic resonance microscopy and stereologic analysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. № 3 (100). С. 1381–1386.

325. 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.

326. 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.

327. Ren Q.-G. [и др.]. Spatial Training Ameliorates Long-Term Alzheimer's Disease-Like Pathological Deficits by Reducing NLRP3 Inflammasomes in PR5 Mice // *Neurotherapeutics*. 2018.

328. Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University [и др.]. PRO-INFLAMMATORY PHENOTYPE OF PERIVASCULAR ASTROCYTES AND CD133+ ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN MURINE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE // *FUNDAMENTAL AND CLINICAL MEDICINE*. 2018. № 1 (3). С. 6–15.

329. 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.

330. 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.
331. Ries M., Sastre M. Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2016. (8).
332. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2009. № 2 (1). С. 228–236.
333. Rockenstein E. [и др.]. Effects of Cerebrolysin on amyloid-beta deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease // *Journal of Neural Transmission. Supplementum*. 2002. № 62. С. 327–336.
334. Rodríguez J.J. [и др.]. Impaired Adult Neurogenesis in the Dentate Gyrus of a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease // *PLoS ONE*. 2008. № 8 (3). С. e2935.
335. Rong L. [и др.]. Bone Marrow CD133⁺ Stem Cells Ameliorate Visual Dysfunction in Streptozotocin-induced Diabetic Mice with Early Diabetic Retinopathy // *Cell Transplantation*. 2018. № 6 (27). С. 916–936.
336. Rosenholm M. [и др.]. Repeated brief isoflurane anesthesia during early postnatal development produces negligible changes on adult behavior in male mice // *PLOS ONE*. 2017. № 4 (12). С. e0175258.
337. Ruan Q. [и др.]. Targeting NAD⁺ degradation: The therapeutic potential of flavonoids for Alzheimer's disease and cognitive frailty // *Pharmacological Research*. 2018. (128). С. 345–358.
338. Rubartelli A. DAMP-Mediated Activation of NLRP3-Inflammasome in Brain Sterile Inflammation: The Fine Line between Healing and Neurodegeneration // *Frontiers in Immunology*. 2014. (5).
339. Ryan S.M. [и др.]. Negative regulation of TLX by IL-1 β correlates with an inhibition of adult hippocampal neural precursor cell proliferation // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013. (33). С. 7–13.

340. Ryan S.M., Kelly Á.M. Exercise as a pro-cognitive, pro-neurogenic and anti-inflammatory intervention in transgenic mouse models of Alzheimer's disease // *Ageing Research Reviews*. 2016. (27). С. 77–92.
341. Sagare A.P., Bell R.D., Zlokovic B.V. Neurovascular Dysfunction and Faulty Amyloid -Peptide Clearance in Alzheimer Disease // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 10 (2). С. a011452–a011452.
342. Saito T., Saido T.C. Neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease // *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2018. № 4 (9). С. 211–218.
343. Sala Frigerio C. [и др.]. The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to A β Plaques // *Cell Reports*. 2019. № 4 (27). С. 1293-1306.e6.
344. Salim S., Chugh G., Asghar M. *Inflammation in Anxiety* Elsevier, 2012. 1–25 с.
345. Salmina A.B. [и др.]. H₂S- and NO-Signaling Pathways in Alzheimer's Amyloid Vasculopathy: Synergism or Antagonism? // *Frontiers in Physiology*. 2015. (6).
346. Saresella M. [и др.]. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease // *Molecular Neurodegeneration*. 2016. № 1 (11). С. 23.
347. Sarkar B., Das A.K., Maiti S. Thermodynamically stable amyloid- β monomers have much lower membrane affinity than the small oligomers // *Frontiers in Physiology*. 2013. (4).
348. Sarlus H., Heneka M.T. Microglia in Alzheimer's disease // *Journal of Clinical Investigation*. 2017. № 9 (127). С. 3240–3249.
349. Sasaki T. [и др.]. Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. № 50 (109). С. 20720–20725.
350. Scheltens N.M.E. [и др.]. Design of the NL-ENIGMA study: Exploring the effect of Souvenaid on cerebral glucose metabolism in early Alzheimer's disease

// Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions. 2016. № 4 (2). C. 233–240.

351. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell // Blood Cells. 1978. № 1–2 (4). C. 7–25.

352. Schroder K., Tschopp J. The Inflammasomes // Cell. 2010. № 6 (140). C. 821–832.

353. Seibenhener M.L., Wooten M.C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice // Journal of Visualized Experiments. 2015. № 96. C. 52434.

354. Selkoe D.J., Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years // EMBO Molecular Medicine. 2016. № 6 (8). C. 595–608.

355. Sengupta U., Nilson A.N., Kaye R. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy // EBioMedicine. 2016. (6). C. 42–49.

356. Serra-Batiste M. [и др.]. A β 42 assembles into specific β -barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016. № 39 (113). C. 10866–10871.

357. Shankar G.M. [и др.]. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory // Nature Medicine. 2008. № 8 (14). C. 837–842.

358. Shankar G.M., Walsh D.M. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β // Molecular Neurodegeneration. 2009. № 1 (4). C. 48.

359. Shao B.-Z. [и др.]. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review // Frontiers in Pharmacology. 2015. (6).

360. Shao B.-Z., Cao Q., Liu C. Targeting NLRP3 Inflammasome in the Treatment of CNS Diseases // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2018. (11). C. 320.

361. Shen Y. [и др.]. Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons // The Journal of Cell Biology. 2016. № 5 (215). C. 719–734.

362. Shibuya N. [и др.]. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009. № 4 (11). С. 703–714.
363. Shoji H. [и др.]. Contextual and Cued Fear Conditioning Test Using a Video Analyzing System in Mice // *Journal of Visualized Experiments*. 2014. № 85.
364. Sierra A. [и др.]. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013. (7).
365. Simi A. [и др.]. Mechanisms of regulation for interleukin-1beta in neurodegenerative disease // *Neuropharmacology*. 2007. № 8 (52). С. 1563–1569.
366. Song H., Stevens C.F., Gage F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons // *Nature Neuroscience*. 2002. № 5 (5). С. 438–445.
367. Song L. [и др.]. NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017. (11).
368. Sorial M.E., El Sayed N.S.E.D. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2017. № 6 (390). С. 581–593.
369. Stehberg J. [и др.]. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala // *The FASEB Journal*. 2012. № 9 (26). С. 3649–3657.
370. Stein L.R., Imai S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2012. № 9 (23). С. 420–428.
371. Su P. [и др.]. The interaction between microglia and neural stem/precursor cells // *Brain Research Bulletin*. 2014. (109). С. 32–38.
372. Suh H., Deng W., Gage F.H. Signaling in Adult Neurogenesis // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2009. № 1 (25). С. 253–275.

373. Sui Y., Horne M.K., Stanić D. Reduced Proliferation in the Adult Mouse Subventricular Zone Increases Survival of Olfactory Bulb Interneurons // PLoS ONE. 2012. № 2 (7). С. e31549.

374. Sun G.J. [и др.]. Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. № 30 (112). С. 9484–9489.

375. Swant J. [и др.]. Methamphetamine Reduces LTP and Increases Baseline Synaptic Transmission in the CA1 Region of Mouse Hippocampus // PLoS ONE. 2010. № 6 (5). С. e11382.

376. Szabo C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2017. № 1 (312). С. C3–C15.

377. Takeda S. [и др.]. Brain interstitial oligomeric amyloid β increases with age and is resistant to clearance from brain in a mouse model of Alzheimer's disease // The FASEB Journal. 2013. № 8 (27). С. 3239–3248.

378. Takeuchi M., Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease // Current Pharmaceutical Design. 2008. № 10 (14). С. 973–978.

379. Tanapat P. Neuronal Cell Markers // Materials and Methods. 2013. (3).

380. Tang J., Oliveros A., Jang M.-H. Dysfunctional Mitochondrial Bioenergetics and Synaptic Degeneration in Alzheimer Disease // International Neurourology Journal. 2019. № Suppl 1 (23). С. S5-10.

381. Taniuchi N. [и др.]. Decreased proliferation of hippocampal progenitor cells in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice: // NeuroReport. 2007. № 17 (18). С. 1801–1805.

382. Tarczyluk M.A. [и др.]. Amyloid β 1-42 Induces Hypometabolism in Human Stem Cell-Derived Neuron and Astrocyte Networks // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2015. № 8 (35). С. 1348–1357.

383. Tartey S., Kanneganti T. Differential role of the NLRP 3 inflammasome in infection and tumorigenesis // Immunology. 2019. № 4 (156). С. 329–338.

384. Teplow D.B. On the subject of rigor in the study of amyloid β -protein assembly // *Alzheimer's Research & Therapy*. 2013. № 4 (5). С. 39.
385. 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.
386. Thakurela S. [и др.]. Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis // *Cell Discovery*. 2016. № 1 (2). С. 15045.
387. Than-Trong E. [и др.]. Neural stem cell quiescence and stemness are molecularly distinct outputs of the Notch3 signalling cascade in the vertebrate adult brain // *Development*. 2018. № 10 (145). С. dev161034.
388. Tietz S., Engelhardt B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions // *The Journal of Cell Biology*. 2015. № 4 (209). С. 493–506.
389. Tincer G. [и др.]. Neural stem/progenitor cells in Alzheimer's disease // *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2016. № 1 (89). С. 23–35.
390. Trouillon R. [и др.]. Angiogenin Induces Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cells through PI-3 and Akt Kinases // *Biochemistry*. 2010. № 15 (49). С. 3282–3288.
391. Trovato A. [и др.]. Redox modulation of cellular stress response and lipoxin A4 expression by *Coriolus versicolor* in rat brain: Relevance to Alzheimer's disease pathogenesis // *NeuroToxicology*. 2016. (53). С. 350–358.
392. Tzeng T.-C. [и др.]. Inflammasome-derived cytokine IL18 suppresses amyloid-induced seizures in Alzheimer-prone mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. № 36 (115). С. 9002–9007.
393. Umaru B. [и др.]. ATP-Sensitive Potassium Channel Activation Induces Angiogenesis In Vitro and In Vivo // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2015. № 1 (354). С. 79–87.
394. Urbán N., Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014. (8).

395. Vandini E. [и др.]. Mechanisms of Hydrogen Sulfide against the Progression of Severe Alzheimer's Disease in Transgenic Mice at Different Ages // *Pharmacology*. 2019. № 1–2 (103). С. 50–60.
396. Venegas C., Heneka M.T. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease // *Journal of Leukocyte Biology*. 2017. № 1 (101). С. 87–98.
397. Verdile G. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? // *Pharmacological Research*. 2004. № 4 (50). С. 397–409.
398. Villemagne V.L. [и др.]. A β deposits in older non-demented individuals with cognitive decline are indicative of preclinical Alzheimer's disease // *Neuropsychologia*. 2008. № 6 (46). С. 1688–1697.
399. Voet S. [и др.]. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases // *EMBO Molecular Medicine*. 2019. С. e10248.
400. Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory // *Nature Protocols*. 2006. № 2 (1). С. 848–858.
401. Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory // *Nature Protocols*. 2006. № 2 (1). С. 848–858.
402. Vukic V. [и др.]. Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway // *Neurobiology of Disease*. 2009. № 1 (34). С. 95–106.
403. Vukovic J. [и др.]. Immature Doublecortin-Positive Hippocampal Neurons Are Important for Learning But Not for Remembering // *Journal of Neuroscience*. 2013. № 15 (33). С. 6603–6613.
404. Walf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents // *Nature Protocols*. 2007. № 2 (2). С. 322–328.

405. Walker D. [и др.]. Receptor for advanced glycation endproduct modulators: a new therapeutic target in Alzheimer's disease // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2015. № 3 (24). С. 393–399.
406. Walsh D.M., Selkoe D.J. A beta oligomers - a decade of discovery // *Journal of Neurochemistry*. 2007. № 5 (101). С. 1172–1184.
407. Wang H. [и др.]. HMGB1/Advanced Glycation End Products (RAGE) does not aggravate inflammation but promote endogenous neural stem cells differentiation in spinal cord injury // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7). С. 10332.
408. Wang J.-F. [и др.]. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury // *Neurochemistry International*. 2014. (64). С. 37–47.
409. Wang R. [и др.]. The role of H₂S bioavailability in endothelial dysfunction // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015. № 9 (36). С. 568–578.
410. Watt A.D., Villemagne V.L., Barnham K.J. Metals, Membranes, and Amyloid- β Oligomers: Key Pieces in the Alzheimer's Disease Puzzle? // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. № s1 (33). С. S283–S293.
411. Wen J. [и др.]. Pax6 directly modulate Sox2 expression in the neural progenitor cells: // *NeuroReport*. 2008. № 4 (19). С. 413–417.
412. Wende C.-Z. [и др.]. Hairy/Enhancer-of-Split MEGANE and Proneural MASH1 Factors Cooperate Synergistically in Midbrain GABAergic Neurogenesis // *PLOS ONE*. 2015. № 5 (10). С. e0127681.
413. Wilcox K.C. [и др.]. A β Oligomer-Induced Synapse Degeneration in Alzheimer's Disease // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2011. № 6 (31). С. 939–948.
414. Wilhelmsson U. [и др.]. Astrocytes Negatively Regulate Neurogenesis Through the Jagged1-Mediated Notch Pathway: Astrocytes Regulate Neurogenesis // *STEM CELLS*. 2012. № 10 (30). С. 2320–2329.
415. Wilhelmsson U. [и др.]. Nestin Regulates Neurogenesis in Mice Through Notch Signaling From Astrocytes to Neural Stem Cells // *Cerebral Cortex*. 2019.

416. Winner B., Winkler J. Adult Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases: Figure 1. // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2015. № 4 (7). C. a021287.
417. Wirths O. Altered neurogenesis in mouse models of Alzheimer disease // Neurogenesis. 2017. № 1 (4). C. e1327002.
418. Wirths O., Bayer T.A. Intraneuronal A β accumulation and neurodegeneration: Lessons from transgenic models // Life Sciences. 2012. № 23–24 (91). C. 1148–1152.
419. Wong R., Cechetto D., Whitehead S. Assessing the Effects of Acute Amyloid β Oligomer Exposure in the Rat // International Journal of Molecular Sciences. 2016. № 9 (17). C. 1390.
420. Woods B. [и др.]. Cognitive stimulation to improve cognitive functioning in people with dementia // Cochrane Database of Systematic Reviews. 2012.
421. Wu P.-J. [и др.]. Deletion of the Inflammasome Sensor *Aim2* Mitigates A β Deposition and Microglial Activation but Increases Inflammatory Cytokine Expression in an Alzheimer Disease Mouse Model // Neuroimmunomodulation. 2017. № 1 (24). C. 29–39.
422. 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.
423. Yamamoto Y. [и др.]. Vascular RAGE transports oxytocin into the brain to elicit its maternal bonding behaviour in mice // Communications Biology. 2019. № 1 (2). C. 76.
424. Yamashita A. [и др.]. Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain: Astrocyts Drive Sleep Disorder Under Pain // Synapse. 2014. № 6 (68). C. 235–247.
425. Yan J.-J. [и др.]. Protection against β -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid // British Journal of Pharmacology. 2001. № 1 (133). C. 89–96.

426. 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.

427. Yang Q. [и др.]. Metabolic regulation of inflammasomes in inflammation // *Immunology*. 2019. С. imm.13056.

428. Yang Z., Ming G., Song H. Postnatal Neurogenesis in the Human Forebrain: From Two Migratory Streams to Dribbles // *Cell Stem Cell*. 2011. № 5 (9). С. 385–386.

429. Yetman M.J., Jankowsky J.L. Wild-Type Neural Progenitors Divide and Differentiate Normally in an Amyloid-Rich Environment // *Journal of Neuroscience*. 2013. № 44 (33). С. 17335–17341.

430. Yeung S.T. [и др.]. Repeated cognitive stimulation alleviates memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model // *Brain Research Bulletin*. 2015. (117). С. 10–15.

431. Yeung S.T. [и др.]. Repeated cognitive stimulation alleviates memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model // *Brain Research Bulletin*. 2015. (117). С. 10–15.

432. Ying Z. [и др.]. Expression of Neural Stem Cell Surface Marker CD133 in Balloon Cells of Human Focal Cortical Dysplasia // *Epilepsia*. 2005. № 11 (46). С. 1716–1723.

433. Yirmiya R., Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011. № 2 (25). С. 181–213.

434. 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.

435. Yu Y.-P., Chi X.-L., Liu L.-J. A Hypothesis: Hydrogen Sulfide Might Be Neuroprotective against Subarachnoid Hemorrhage Induced Brain Injury // *The Scientific World Journal*. 2014. (2014). С. 1–9.

436. Zeis T. [и др.]. Metabolic gene expression changes in astrocytes in Multiple Sclerosis cerebral cortex are indicative of immune-mediated signaling // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015. (48). С. 313–325.

437. Zeng J. [и др.]. Spatial training promotes short-term survival and neuron-like differentiation of newborn cells in A β 1-42 -injected rats // *Neurobiology of Aging*. 2016. (45). С. 64–75.

438. Zeng J. [и др.]. Spatial training promotes short-term survival and neuron-like differentiation of newborn cells in A β 1-42 -injected rats // *Neurobiology of Aging*. 2016. (45). С. 64–75.

439. Zeng J. [и др.]. Spatial training promotes short-term survival and neuron-like differentiation of newborn cells in A β 1-42 -injected rats // *Neurobiology of Aging*. 2016. (45). С. 64–75.

440. Zhang J. [и др.]. Hydrogen sulfide therapy in brain diseases: from bench to bedside // *Medical Gas Research*. 2017. № 2 (7). С. 113.

441. Zhang J., Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis // *BioMed Research International*. 2015. (2015). С. 1–14.

442. Zhang J., Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis // *BioMed Research International*. 2015. (2015). С. 1–14.

443. Zhang L., Postina R., Wang Y. Ectodomain shedding of the receptor for advanced glycation end products: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009. № 24 (66). С. 3923–3935.

444. Zhang M. [и др.]. Lactate Deficit in an Alzheimer Disease Mouse Model: The Relationship With Neuronal Damage // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2018. № 12 (77). С. 1163–1176.

445. 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.

446. 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.

447. Zhang Y. [и др.]. Effect of intraperitoneal or intracerebroventricular injection of streptozotocin on learning and memory in mice // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018.

448. Zhao Y. [и др.]. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus // *Nature*. 2011. № 7366 (477). С. 596–600.

449. Zhao Y. [и др.]. TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function // *Neuron*. 2018. № 5 (97). С. 1023-1031.e7.

450. Zhu J., Wu X., Zhang H.L. Adult neural stem cell therapy: expansion in vitro, tracking in vivo and clinical transplantation // *Current Drug Targets*. 2005. № 1 (6). С. 97–110.

451. Zhuo J.-M. [и др.]. Young adult born neurons enhance hippocampal dependent performance via influences on bilateral networks // *eLife*. 2016. (5). С. e22429.

452. 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.

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

454. Zuo Y. [и др.]. Inhibition of Heat Shock Protein 90 by 17-AAG Reduces Inflammation via P2X7 Receptor/NLRP3 Inflammasome Pathway and Increases Neurogenesis After Subarachnoid Hemorrhage in Mice // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018. (11). С. 401.