

Комлева Юлия Константиновна

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

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

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

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Салмина Алла Борисовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Томск)

**Удуг
Елена
Владимировна**

доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нормальной физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (Казань)

**Мухамедьяров
Марат
Александрович**

доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией нейробиологии НИИКИ СО РАМН федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" (НИИФКИ) (Новосибирск)

**Маркова
Евгения
Валерьевна**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научный центр неврологии" (ФГБНУ НЦН) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Москва

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

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

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Угрюмов М.В., 2014; Forloni G., 2018].

БА представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, в патогенезе которого первоочередную роль играют растворимые олигомеры бета-амилоида [Amini E., 2015]. Растворимые олигомеры являются токсичными для нейронов *in vitro* и *in vivo*. Изменения в головном мозге, индуцированные токсичным действием бета-амилоида, затрагивают в первую очередь гиппокамп, приводя к драматическому снижению когнитивных функций [Benilova I., 2012; Vode D.C., 2017].

Зубчатая извилина (ЗИ) 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 [Pérez-Domínguez M., 2017]

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 нейровоспаления, ассоциированном с нейродегенерацией [Bjornsson C.S., 2015].

Настоящее диссертационное исследование сфокусировано на изучении новых клеточных и молекулярных механизмов формирования нейрогенного микроокружения в головном мозге в норме и при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа, понимании механизмов нарушения пластичности головного мозга при прогрессировании нейровоспаления, характерного для хронической нейродегенерации, и обосновании новых стратегий для восстановления когнитивных функций, утраченных в результате хронической нейродегенерации.

Степень разработанности темы исследования.

Учитывая то, что головной мозг обладает способностью поддерживать когнитивные функции, несмотря на то, что они находятся под постоянным негативным влиянием стрессовых факторов и дегенеративных событий, связанных со старением и развитием БА, все больший интерес вызывает изучение так называемого «когнитивного резерва головного мозга». 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» [Dainikova E.I., 2014].

Особо актуальным становится использование технологий управления регенеративным потенциалом головного мозга при лечении таких патологий, сопряженных с развитием когнитивного дефицита, как БА [Horowitz A.M., 2017]. Нейральные 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 [Casares-Crespo L., 2018]. Нейрогенез включает генерацию, миграцию, выживание, дифференцировку и функциональную интеграцию вновь образованных нейронов в функциональные нейронные цепи (Рисунок 1).

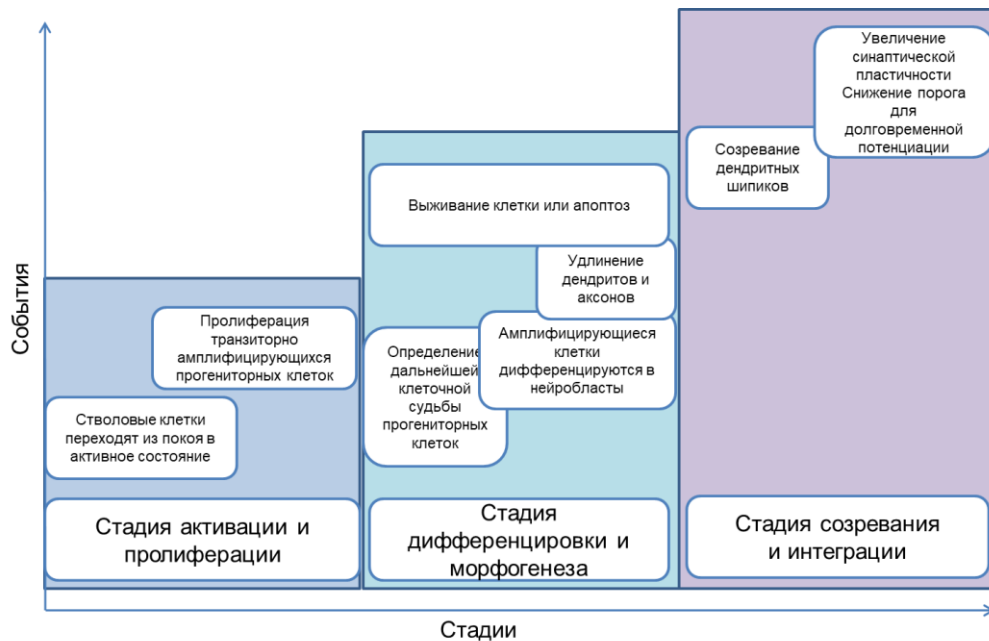


Рисунок 1 – Основные события нейрогенеза в головном мозге в постнатальном периоде. Оригинальная схема, составленная по данным литературы.

Все эти процессы происходят при регуляции различными факторами, выделяемыми в нейрогенной нише, которая обеспечивает локальное микроокружение и способствует поддержанию процесса взрослого нейрогенеза [Lupo G., 2019]. 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 в гиппокампе у взрослых связано с прогрессированием БА, тем не менее до сих пор вклад нейрогенеза гиппокампа в патофизиологию этого заболевания является неопределенным [Selkoe D.J., 2016].

Идентификация различных эндогенных факторов, регулирующих активность НСК, может способствовать дальнейшему пониманию нейронного онтогенеза, а также развитию новых терапевтических стратегий восстановления мозга [Pérez-Domínguez M., 2017]. Так например, недавно в литературе появились описания

стимулирующего влияния выделения цитокинов астроцитами на нейрогенез и синаптогенез [Chugh D., 2015].

Развитие нейровоспаления может существенным образом влиять на функционирование нейрогенных ниш, эффективность нейрогенеза, направленной миграции и системной интеграции вновь образованных клеток, однако насколько однозначно такое влияние и как оно регулируется, остается не выясненным [Fan L.-W., 2017].

Существует много потенциальных факторов, способствующих хроническому нейровоспалительному состоянию при БА. Одним из них является сборка так называемого цитозольного мультипротеинового комплекса – инфламмосомы NLRP3 [Shao B.-Z., 2015].

Все больше данных свидетельствует о том, что нейровоспаление влияет на нейрогенные ниши и взрослый нейрогенез, что способствует патогенезу многочисленных нейродеструктивных, нейропсихиатрических и неврологических расстройств. 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.

При БА, по мере развития церебральной амилоидной ангиопатии, нарушается структура и функция сосудов мозга и клеток в нейроваскулярной единице [Giuliani A., 2019]. 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 [Presta I., 2018]. Газовый транмиттер H_2S является эндогенным газообразным медиатором, который вырабатывается, в том числе и в клетках астроглиальной природы, нейронах и эндотелии. H_2S у млекопитающих продуцируется главным образом ферментативными путями. Одним из ферментов для образования H_2S в эндотелиоцитах является цистатионин- γ -лиаза (CSE). Биологические эффекты H_2S , особенно в центральной нервной системе, остаются до конца не выясненными [Mun J., 2019]. 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 клеточных 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 трансмиттера 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 трансмиттера 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.

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 БА, что позволяет использовать их для разработки методов ранней диагностики. Идентифицированы новые роли NLRP3, CSE и RAGE в нормальном развитии головного мозга и формировании нейрогенного микроокружения в норме и при патологии.

Доказана роль пространственной тренировки в увеличении «когнитивного резерва» и пула НСК 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 БА.

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 хронической нейродегенерации.

Существенно дополнена концепция патогенеза нейродегенерации, связанной с развитием воспаления, с актуализацией механизмов нарушения нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга и дизрегуляции 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, мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия B6SLJ Tg(APPs^{wFILon},PSEN1^{*M146L}*L286V)6799Vas/Mm), B6.129S6-Nlrp3^{tm1Bhk/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.

Исследование выполнялось на базе кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, в научно-исследовательском институте молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ. Часть экспериментов выполнена на базе Немецкого института исследования питания человека (German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke (DIfE)), Потсдам, Германия; Экспериментального и клинического центра Университета Шарите, Берлин, Германия (профессор Майк Голлаш, профессор Штефания Кремер).

Положения, выносимые на защиту:

1. НАД⁺-катализирующие ферменты, сероводород-синтезирующие 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 патологическому нейрогенезу за счет изменения пролиферации нейрональных предшественников, что ассоциировано с разнонаправленной экспрессией CD38 и CD157 в астроцитах и нейронах, увеличением экспрессии медиаторов воспаления, рецепторов конечных продуктов гликирования белков RAGE в клетках зубчатой извилины гиппокампа, аберрантным ангиогенезом и нарушением структурной целостности ГЭБ, а также изменениями сложных форм поведения на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера в эксперименте.

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 болезни Альцгеймера в эксперименте.

5. Развитие экспериментальной болезни Альцгеймера сопровождается нарушением астроцит-опосредованного контроля нейрогенеза, оптогенетическая стимуляция GFAP+ клеток в составе нейрогенных ниш частично восстанавливает пролиферативный потенциал стволовых и прогениторных клеток *in vitro*.

Степень достоверности и апробация результатов.

Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, которая подтверждается тем, что научные положения и выводы диссертации обоснованы и получены с использованием современных методических приемов и высокоинформативных методов исследования (иммуногистохимия, иммуноферментный анализ, электрофизиологическое исследование), на высокотехнологичном оборудовании. В проведенных экспериментах использована достаточная выборка исследуемых животных в соответствии с основными принципами работы с лабораторными живыми объектами, получен значительный объем лабораторного материала; результаты исследования были подвергнуты адекватному статистическому анализу.

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 28th 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.

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).

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 400 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.

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; подготовку публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, сформулирована рабочая гипотеза, определены цель, задачи исследования, научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертации исследования, а именно, описаны известные данные о патогенных факторах, влияющих на процессы нейрогенеза в нейрогенной нише головного мозга в норме и при нейродегенерации. Основная часть главы посвящена описанию основных клеточных и молекулярных компонентов нейрогенной ниши. Охарактеризованы нейрональные стволовые клетки с описанием этапов развития НСК в зрелые клетки. Кроме того, описана роль когнитивной стимуляции в процессах нейрогенеза. Также в данной главе дана характеристика болезни Альцгеймера, роли нейровоспаления в развитии и прогрессировании нейродегенерации с описанием функции основных цитокиновых медиаторов. Глава иллюстрирована рисунками и таблицами.

Во второй главе диссертации описаны материал и методы исследования. Объект исследования: крысы и мыши 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(APP^SwFILon,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 C57BL/6 в возрасте 10-14 суток постнатального развития для получения нейросфер.

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 Локального этического комитета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Дизайн исследования и группы.

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.

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 10-дневный 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.

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.

1 группа – мыши линии CD1 с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в CA1 зону гиппокампа – контрольная группа ложно-оперированных мышей (n=7); *2 группа* – мыши линии CD1 с введением A β 1-42 в CA1 зону гиппокампа (n=7) экспериментальная группа мышей с моделью болезни Альцгеймера.

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).

1 группа – мыши линии C57BL/6 (n=7) – контрольная группа; *2 группа* – мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия B6SLJ Tg(APP^SwF1L^{on},PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799Vas/Mm) (n=10) – экспериментальная 5xFAD модель.

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

1 группа – мыши линии C57BL/6 с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) в CA1 зону гиппокампа (n=10) – контрольная группа; *2 группа* – мыши линии C57BL/6 с введением A β 1-42 в CA1 зону гиппокампа (n=10) – экспериментальная группа.

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

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.

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

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.

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.

1 группа – мыши линии C57BL/6, мыши дикого типа WT (n=7) – контрольная группа; 2 группа – *CSE*-нокаутные мыши (n=10) – *CSE*^{-/-} или *CSE* KO – экспериментальная группа.

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

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

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

Моделирование болезни Альцгеймера проводили с использованием стереотаксического метода с применением протокола введения растворимых олигомерных форм амилоида Аβ1-42 в гиппокамп мышей или крыс [Epelbaum S., 2015].

Изучение миграции клеток: Чтобы идентифицировать мигрирующие нейробласты субгранулярной зоне и степень их миграции в гранулярный слой, BrdU (50 мг/кг, внутрибрюшинно) вводили два раза в день в течение 3 последовательных дней, начиная с 4 дня после инъекции бета-амилоида или PBS [Sui Y., 2012].

Нейроповеденческое тестирование. С целью изучения тревожности, поисковой активности, эмоционального поведения использовали тест «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Темно-светлую камеру». Для исследования социального поведения проводили «Пятипопыточный социальный тест», «Трехкамерный тест на социализацию». В качестве тестов оценивания когнитивных функций были использованы тесты: «Распознавание нового объекта», «Условно-рефлекторное замирание», «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ). ВЛМ

был также использован в качестве парадигмы когнитивной стимуляции для грызунов.

Иммуногистохимическое исследование и конфокальная микроскопия. На 14 день через 30 минут после тестирования в ВЛМ осуществляли транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом с последующим забором головного мозга. Срезы толщиной 50 мкм, изготовленные с помощью вибратора (Thermo Scientific), окрашивали по методике для свободно плавающих срезов по стандартному протоколу двойного/тройного мечения методом иммуногистохимии.

Для изучения экспрессии маркеров нейрогенеза и идентификации клеток использовали следующие антитела: 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, Anti- Ki67 antibody, Abcam ab15580, Anti- PCNA antibody, Abcam ab92552, Anti-S100beta antibody, Abcam ab14849, Anti- NeuN antibody, Abcam ab177487, Anti- Doublecortin antibody, Abcam ab18723, Anti- NeuroD1 antibody, Abcam ab177487, Anti- MAP-2 antibody, Abcam ab18723; для изучения миграции Anti- BrdU antibody, Merc, B8434; для изучения структурной пластичности Anti- Arc antibody, Abcam ab118929, Anti- c-fos antibody, Abcam ab209794; для определения маркеров воспаления Anti- NLRP3 antibody, Abcam ab4207, Anti- IL1beta antibody, Abcam ab9722, Anti- HMGB1 antibody, Abcam ab18256; изучения ангиогенеза Anti-VEGFR2 antibody, Abcam ab2349, Anti- CD31 antibody, Abcam ab28364, Anti- JAM1 antibody, Abcam ab180821. 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 [Zinchuk V., 2007].

Окрашивание бета-амилоида. Для окрашивания включений бета-амилоида использовали краситель Тиофлавин S.

Оценка апоптоза методом TUNEL. 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).

Иммуноферментное определение уровня лактата. Концентрацию лактата в гомогенатах гиппокампа проводили методом иммуноферментного анализа согласно протоколу, представленному в наборе: L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (ab65330) [Girardot T., 2018].

Иммуноферментное определение уровня интерлейкина 1 бета (IL-1 β). Концентрация IL-1 β в гомогенатах гиппокампа была определена методом иммуноферментного анализа согласно протоколу, представленному в наборе: IL-1 beta Mouse ELISA Kit 96 tests (KMC0011).

Электрофизиологическое исследование. В электрофизиологических экспериментах использовались коронарные живые срезы головного мозга,

помещенные в ледяной (+4°C) раствор искусственной СМЖ (иСМЖ), перфузируемой смесью газов 5%CO₂ и 95% O₂. Регистрация пВПСП производилась с помощью Cl-Ag электрода в стеклянной боросиликатной пипетке, заполненной иСМЖ. Стимуляция пресинаптических волокон производилась с помощью платино-иридиумового электрода с сопротивлением 5 МΩ. Запись потенциалов и стимуляция производилась с помощью усилителя НЕКА EPC10 USB с CA1 и CA3 зон гиппокампа. Данные образования визуально определялись по характерным формам при увеличении объектива x10.

Выделение и культивирование нейросфер. Источником клеток головного мозга служили мыши в C56Bl/6 возрасте 10-14 суток. Выделение нейросфер проводили по методике [Моргун А.В., 2016]. Полученные клетки в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл сеяли в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл 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). Через 7-9 дней наблюдали образование монослоя астроцитов. Для формирования сокультуры нейросфер и астроцитов использовали культуральные планшеты с вставками. Нейросферы засевались 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.

Оптогенетическая стимуляция. Амплификация аденовирусов и трансфекция. Для достижения высокого уровня экспрессии белка ChR2 в астроцитах был использован AVV-вектор с сильным промотором GFAP (С. Каспаров, Великобритания). После посадки астроцитов в чашку Петри, они были трансфицированы GFAP-ChR2-mKate.

Фотоактивация астроцитов, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate. Клетки, экспрессирующие GFAP-ChR2-mKate, обнаруживались по аутофлуоресценции белка mKate. Активация оптогенетической конструкции достигалась при подаче средней интенсивности синего света от светодиода (480 nm).

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).

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.

Третья глава диссертационной работы посвящена описанию полученных результатов. Результаты представлены по блокам. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками.

Четвертая глава диссертации посвящена анализу и обсуждению полученных результатов с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе.

Блок I. Результаты исследований влияния пространственной тренировки и введения растворимых олигомеров на процессы обучения, запоминания, нейрогенеза, нейровоспаления

В пронеурогенных условиях, таких как когнитивная стимуляция, уровни экспрессии H_2S , продуцируемого CSE, а также экспрессии RAGE рецепторов и NLRP3-инфламмасом, увеличиваются, обеспечивая формирование условий для реализации нейрогенного потенциала НСК. При нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией при БА, происходит активация глии и высвобождение провоспалительных цитокинов $IL1\beta$, HMGB, регистрируются супрафизиологические уровни экспрессии NLRP3 инфламмасом и лигандов RAGE, что стимулирует развитие НСК в направлении астроглии, но не нейрональных клеток-предшественников.

В ходе эксперимента был доказан умеренный дефицит пространственной памяти и развитие тревожного поведения у крыс, инъецированных олигомерами $A\beta$. Мы установили влияние пространственного обучения на ранние этапы нейрогенеза, а также нейрональной дифференцировки. 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 БА. Исследование продемонстрировало, что пространственная тренировка способствует пролиферации НСК в субгранулярной зоне зубчатой извилины в здоровом головном мозге, но не при нейродегенерации (Рисунок 2).

В исследовании установлено, что пространственное обучение способствует преимущественной дифференцировке клеток по нейрональному пути у крыс с инъекцией $A\beta 1-42$. В качестве маркера нейробластов оценивали PSA-NCAM. 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).

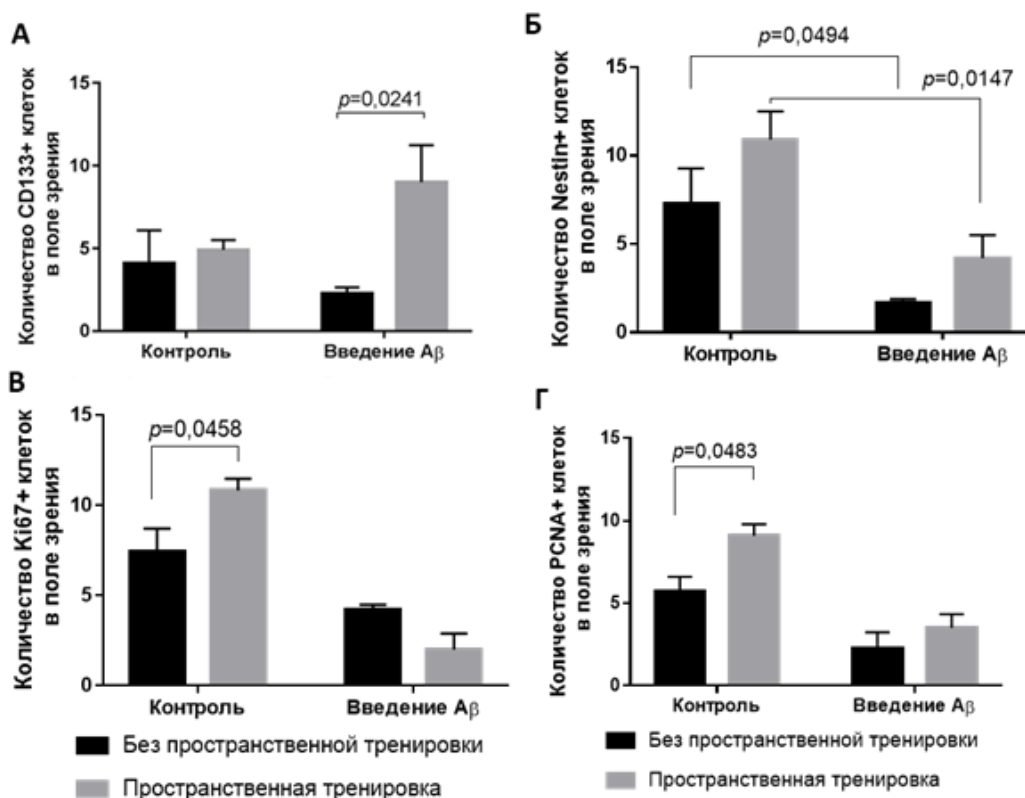


Рисунок 2 – (А) Количество CD133+ клеток; (Б) Количество Nestin+ клеток; (В) Количество Ki67+ клеток; (Г) Количество PCNA+ клеток. Исследования выполнены в ЗИ гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампулярная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампулярная инъекция бета-олигомеров.

При оценке экспрессии 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). Кроме того, в исследовании была определена экспрессия маркера периваскулярной астроглии S100beta. Выявлено статистически значимое влияние типа операции на экспрессию S100beta: ($F(1,24) = 59,87$, $p < 0,0001$), а также значимое влияние когнитивной тренировки ($F(1,24) = 4,391$, $p = 0,0468$) (Рисунок 3).

Также мы показали, что пространственная тренировка способствует миграции нейробластов из субвентрикулярной зоны к ольфакторным луковицам по ростральному миграционному пути при нейродегенерации, поскольку число мигрирующих BrdU+/P-NCAM+ нейробластов увеличивалось более чем в 7 раз. Тем не менее, в ходе эксперимента показано, что пространственная тренировка не влияет на выживаемость вновь образованных нейронов.

Таким образом, пространственное обучение, 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.

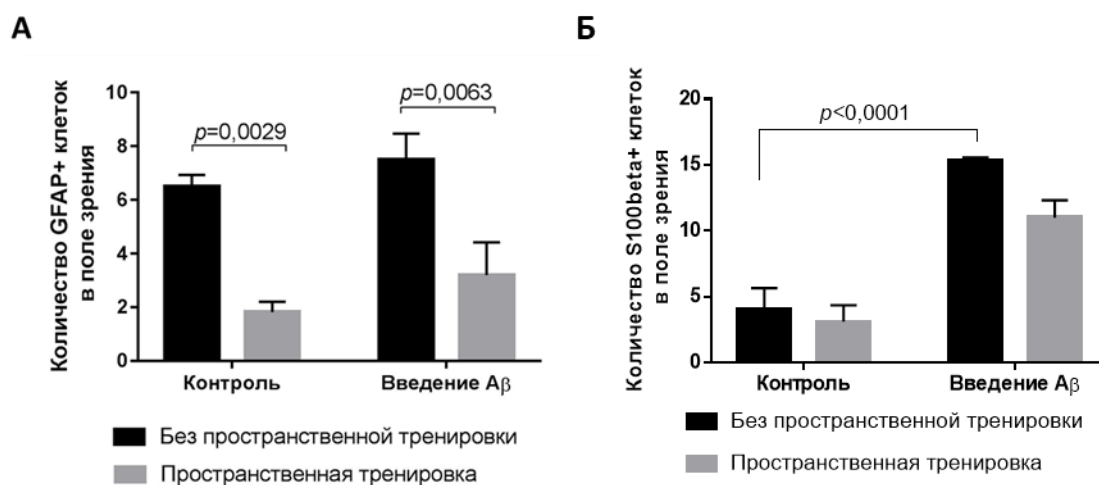


Рисунок 3 – (А) Количество GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. (Б) Количество S100beta+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение Аβ – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

Интересным и не описанным до этого феноменом является то, что пространственная тренировка приводит к разнонаправленному изменению экспрессии инфламмасом в здоровом и патологичном мозге. В данной серии экспериментов 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 Аβ. При этом было показано, что тренировка в водном лабиринте Морриса (ВЛМ) не приводит к изменению экспрессии инфламмасом в стволовых клетках, базальных прогениторных клетках, а также нейробластах при введении олигомеров Аβ.

Интересным наблюдением является то, что пространственная тренировка приводит к увеличению экспрессии инфламмасом NLRP3 в нейробластах нейрогенных ниш в здоровом мозге (Таблица 1).

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 этом при множественном попарном сравнении с использованием критерия Tukey's различий выявлено не было (Рисунок 4).

Мы зарегистрировали увеличение экспрессии инфламмасом после тренировки в плюрипотентных стволовых клетках и нейробластах в здоровом головном мозге. Инъекция Аβ вызывает увеличение экспрессии NLRP3+ клеток вне зависимости от длительности исполнения задания в ВЛМ. 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 ВЛМ. Таким образом,

обучение способствует увеличению экспрессии NLRP3 инфламмасом в нейробластах в нейрогенной нише гиппокампа. 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.

Таблица 1 – Количество клеток на разных этапах нейрогенеза и в астроцитах в нейрогенной нише в поле зрения, колокализованных с NLRP3 инфламмассомами

Группы	Контроль		Экспериментальная БА	
	Без когнитивной тренировки	С когнитивной тренировкой	Без когнитивной тренировки	С когнитивной тренировкой
CD133/NLRP3	0,4±0,1 <i>p1</i> =0,0166	0,9±0,1	0,627±0,15	0,63±0,07
Nestin/NLRP3	0,2±0,1 <i>p2</i> =0,0327	0,3±0,1	0,8±0,2	0,74±0,15
Pax6/NLRP3	1,2±0,2	1,35±0,1	0,9±0,18	1,12±0,2
PSA-NCAM/NLRP3	0,82±0,11 <i>p1</i> <0,0001; <i>p2</i> =0,0294	4,0±0,3 <i>p3</i> <0,0001	0,09±0,09	0,43±0,009
GFAP/NLRP3	0,68±0,12	0,27±0,14	0,28±0,08	0,52±0,18
S100beta/NLRP3	0,66±0,19	0,62±0,18	0,86±0,2	0,74±0,12
NeuN/NLRP3	7,32±2,4	14,9±3,1	16,7±4,2	17,86±3,8

Примечание: *p1* – уровень статистической значимости различий относительно показателей группы контроля без пространственной тренировки; *p2* – уровень статистической значимости различий относительно показателей группы экспериментальной болезни Альцгеймера (БА) без пространственной тренировки; *p3* – уровень статистической значимости различий относительно показателей группы экспериментальной БА с пространственной тренировкой.

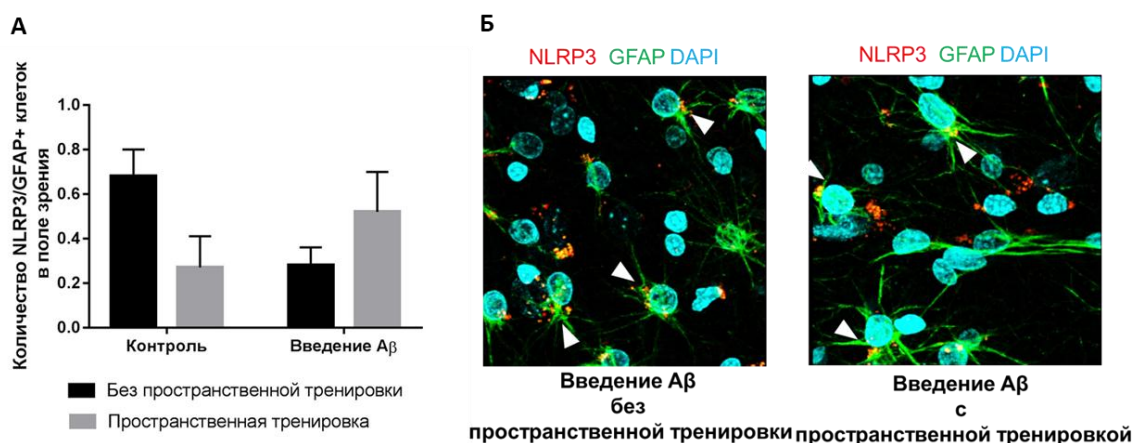


Рисунок 4 – (А) Количество NLRP3/GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения в группах с и без пространственной тренировки. Контроль – внутригиппокампаальная инъекция PBS, введение Aβ – внутригиппокампаальная инъекция бета-олигомеров. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах после введения бета-амилоида с и без пространственной тренировки. Наложение сигналов: ядра клеток прокрашены DAPI (синий), экспрессия GFAP (зеленый), экспрессия NLRP3 (красный).

В совокупности это дает основания предполагать, что опосредованные активностью инфламмасом клеточные сигнальные пути в НСК и нейробластах сопровождают процессы запоминания (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Роль когнитивной стимуляции в функционировании компонентов нейрогенной ниши. НСК – нейрональные стволовые клетки.

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 Аβ 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 3). В субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа выявлена такая же тенденция экспрессии CD157. Это позволяет заключить о сходном паттерне экспрессии молекул одного семейства НАД⁺-конвертирующих ферментов в зрелых гранулярных нейронах нейрогенной ниши головного мозга.

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

При определении экспрессии CD38 в астроцитах, экспрессирующих GFAP, было установлено, что после токсического воздействия Аβ 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). 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 Аβ.

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

Блок II. 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 олигомеров A β 1-42 на ранние этапы гиппокампального нейрогенеза, а также экспрессию инфламмасом и процессы кратковременной и отсроченной памяти у мышей линии CD1.

На этапе приобретения памяти выявлены нарушения у мышей с инъекцией A β : кривая обучения продемонстрировала характерные для нарушений в гиппокампе изменения. Во второй контекстный день мыши с моделированием БА также замирали меньше, что свидетельствует о патологии ассоциативной недавней памяти. В третий сигнальный день мыши после введения олигомеров A β не сумели связать подаваемый шум с новым контекстом. Аналогичные нарушения наблюдались и в отсроченном периоде.

Выявленные изменения экспрессии маркеров нейрогенеза представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Количество клеток на разных этапах нейрогенеза и в астроцитах в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения.

Маркеры	Контроль	Экспериментальная БА
Ki67	7,2 \pm 1,7 ($p=0,0256$)	2,3 \pm 0,9
CD133	13,4 \pm 0,8	11,6 \pm 0,7
Nestin	16,7 \pm 3,8 ($p=0,0388$)	6,4 \pm 2,3
PSA-NCAM	16,8 \pm 2,9	13,2 \pm 4,1
BrdU	21 \pm 1,33	22 \pm 1,38
S100beta	2,45 \pm 0,38 ($p<0,0001$)	6,1 \pm 0,29

Примечание: p – уровень статистической значимости различий относительно показателей экспериментальной группы с моделированием БА (болезни Альцгеймера).

Было показано, что амилоид-индуцированные изменения в гиппокампе сопровождаются снижением числа активированных, делящихся НСК в зубчатой извилине и увеличением протоплазматических астроцитов (Рисунок 6).

Введение растворимых олигомеров A β вызывает нарушение радиальной миграции клеток: 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 колокализуются с маркером зрелых нейронов NeuN, при БА клетки преимущественно оставались в субгранулярном слое (Рисунок 7).

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.

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).

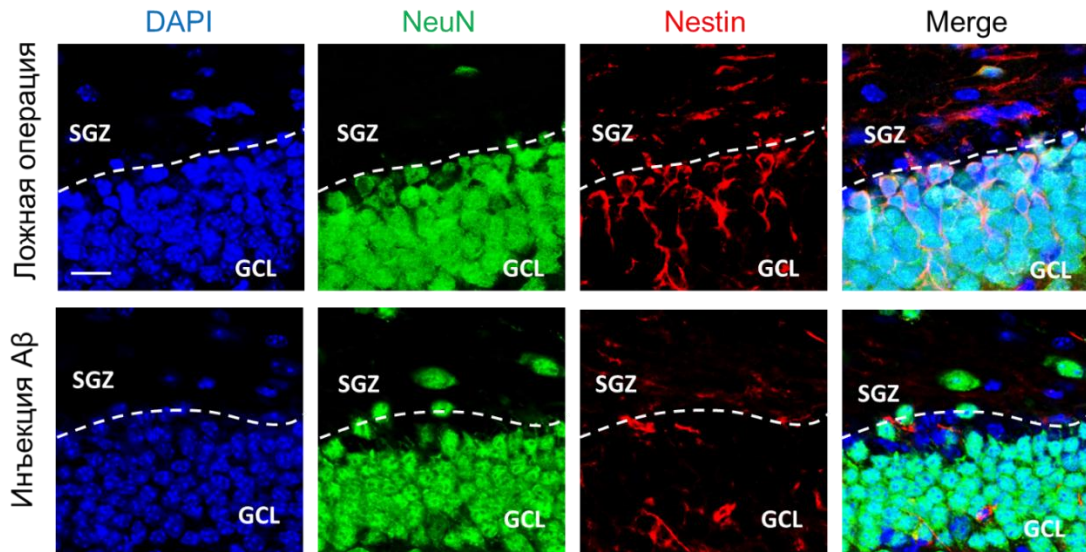


Рисунок 6 –Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание ЗИ гиппокампа в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия Nestin (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

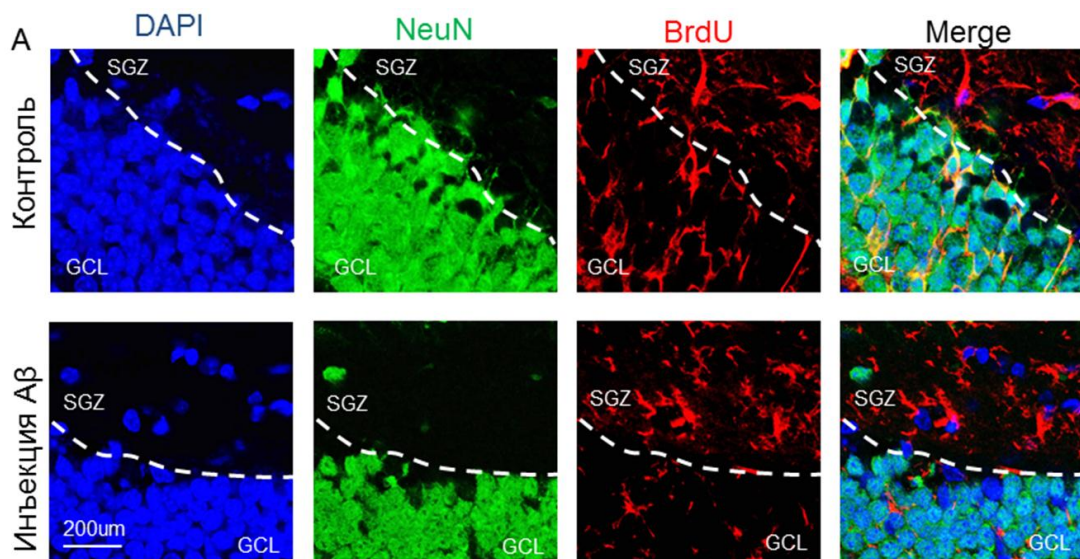


Рисунок 7 – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в зубчатой извилины гиппокампа группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия BrdU (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 200мкм.

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в экспрессии GFAP-позитивных астроцитов, основываясь на морфологии клеток, зафиксированы изменения, характерные для реактивного астроглиоза при нейродегенерации. Так было зафиксирована гипертрофия тела клетки, удлинение отростков по сравнению с астроцитами в головном мозге животных контрольной группы (Рисунок 8).

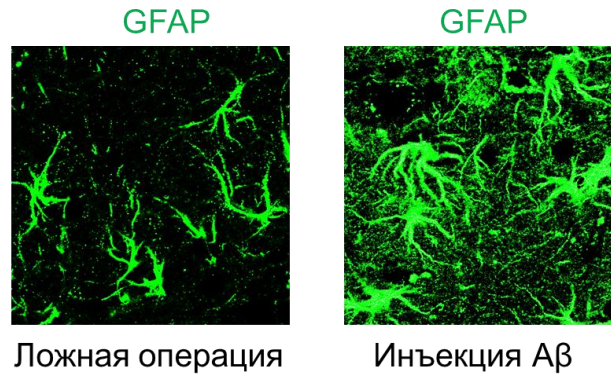


Рисунок 8 – Микрофотография иммунофлюоресцентного окрашивания GFAP+ астроцитов зубчатой извилины гиппокампа в группе после проведения ложной операции и инъекции бета-амилоида.

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 Aβ1-42. Полученные данные указывают на снижение скорости пролиферации в субгранулярной зоне, 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 9).

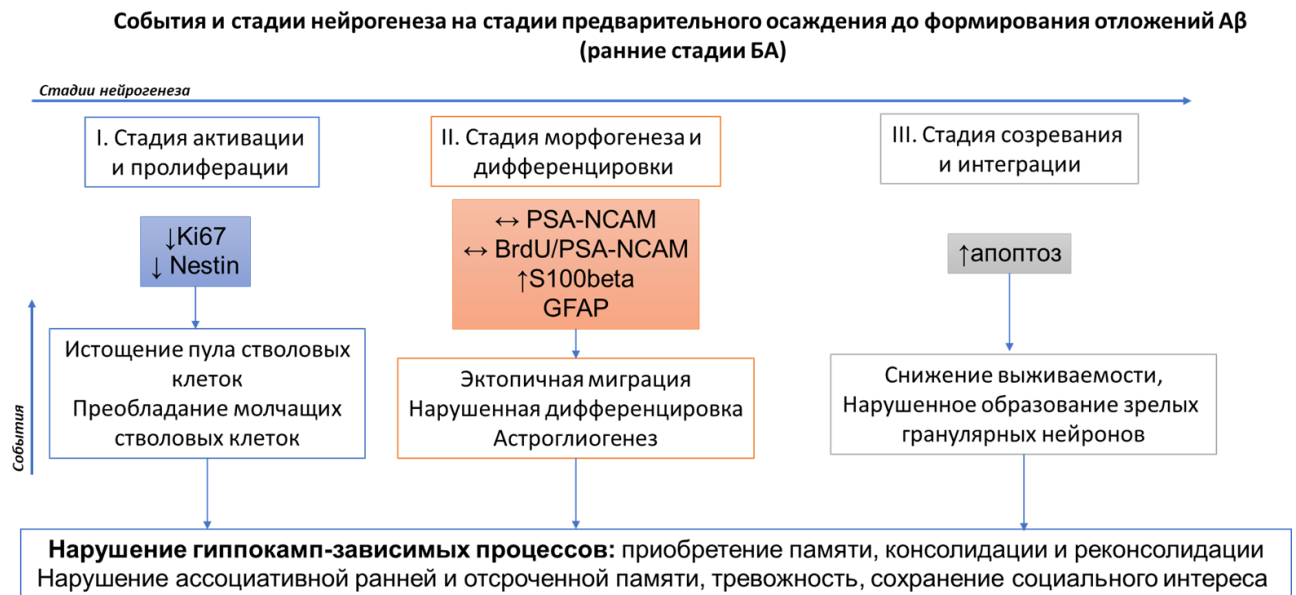


Рисунок 9 – События и стадии нейрогенеза на стадии до формирования отложений Aβ (ранние стадии БА).

Результаты исследования особенностей экспрессии NLRP3 инфламмасом в нейрональных предшественниках в норме и при введении A β

В ходе данного исследования была оценена колокализация NLRP3 инфламмасом и плюрипотентных стволовых клеток, экспрессирующих CD133, а также Nestin⁺ мультипотентных стволовых клеток. Было зафиксировано, что инъекция олигомеров бета-амилоида приводит к увеличению экспрессии NLRP3 мультибелкового комплекса на обоих типах стволовых клеток (Рисунок 10). Это в свою очередь может свидетельствовать о том, что функциональная активность этих клеток меняется, реализуя воспалительный фенотип.

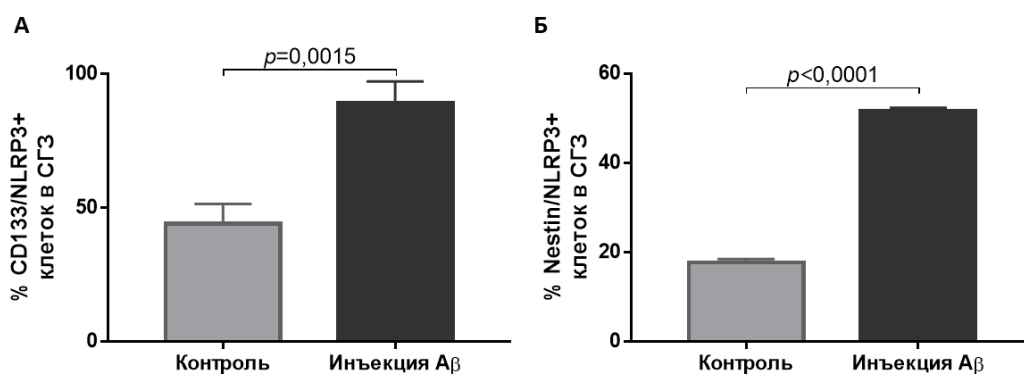


Рисунок 10 – (А) Процент клеток, колокализирующих маркеры CD133/NLRP3⁺ в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. (Б) – (А) Процент клеток, колокализирующих маркеры Nestin/NLRP3⁺ в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – внутригиппокампальная инъекция PBS, введение A β – внутригиппокампальная инъекция бета-олигомеров.

В норме в здоровом мозге также обнаружено, что НСК способны продуцировать NLRP3 инфламмасы. 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 (IL-1 β 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 β в клетках глиальной природы, а также до сих пор остается открытым вопрос экспрессии астроцитами IL1 β в настоящем исследовании была определена экспрессия NLRP3 и IL1 β на астроцитах при амилоид-индуцированной нейродегенерации.

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. Мы установили, 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 (Рисунок 11). По всей видимости, базальные уровни секреции провоспалительных цитокинов могут быть важны для процессов нейрогенеза и миграции клеток, что обеспечивает процессы консолидации памяти, тогда как выраженное нейровоспаление нарушает процессы нейрогенеза.

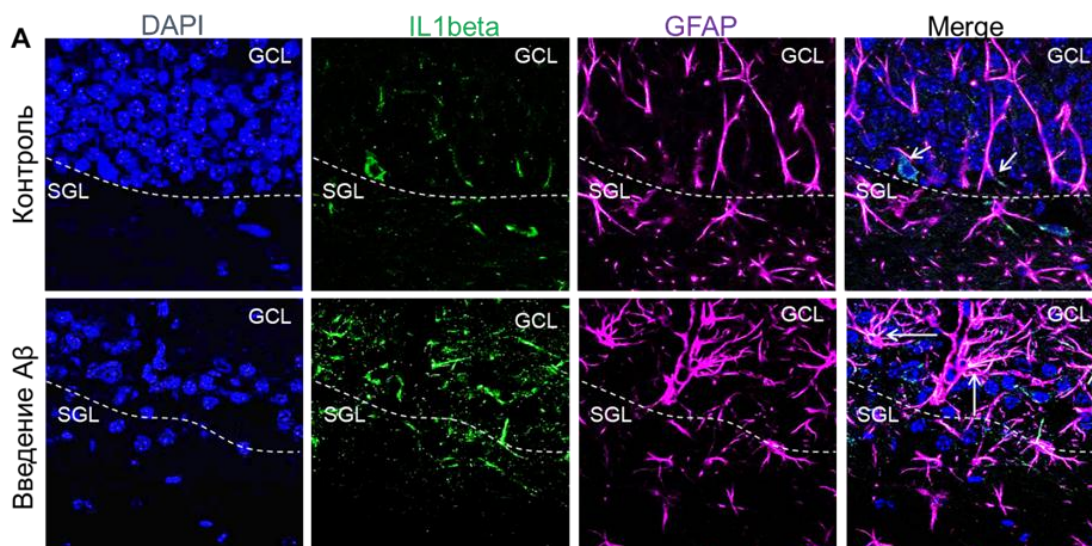


Рисунок 11 –Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание зубчатой извилины гиппокампа в группах после проведения ложной операции и введения бета-амилоида: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия IL1beta (зеленый), в третьей колонке – экспрессия GFAP (сиреневый), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Таким образом, развитие воспаления в ткани головного мозга при нейротоксическом действии А β связано с формированием NLRP3-инфламмасом, гиперпродукцией провоспалительного интерлейкина 1 и HMGB1 в нейрогенной нише головного мозга, что в конечном итоге может приводить к нарушению процессов синаптогенеза и нейрогенеза, ассоциированных с репарацией или реализацией когнитивных функций.

Блок III. 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 экспрессия NLRP3 инфламмасом в гиппокампе в клетках астроглиальной и нейрональной природы. Выявлено статистически значимое увеличение локализации NLRP3 инфламмасом клетками, экспрессирующими GFAP и NeuN, по увеличению коэффициента перекрытия по Mander's у трансгенных мышей с БА (Рисунок 12).

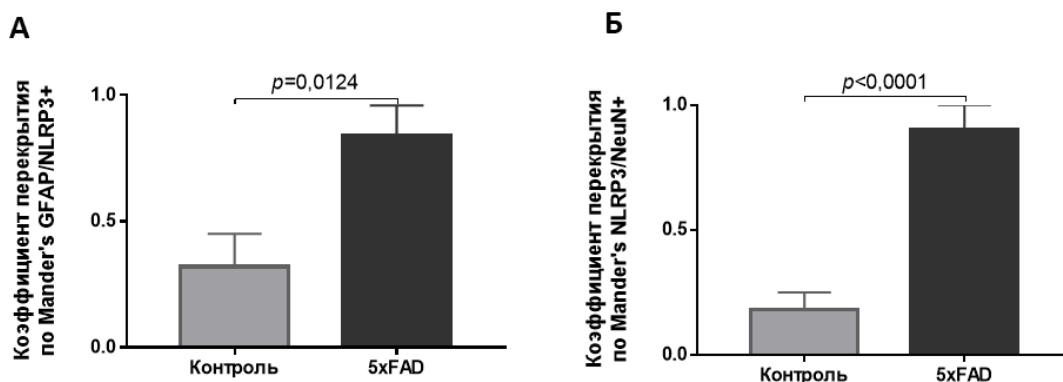


Рисунок 12 – (А) Коэффициент перекрытия по Mander's GFAP/NLRP3+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. (Б) Коэффициент перекрытия по Mander's NeuN/NLRP3+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. Контроль – мыши дикого типа C57Bl6, 5xFAD – генетическая модель болезни Альцгеймера.

Блок IV. Результаты изучения эффекта введения олигомеров A β на экспрессию генов раннего реагирования после тестирования когнитивных функций. Экспрессия маркеров ангиогенеза и RAGE

Количественная оценка подтвердила снижение экспрессии c-fos в гиппокампе у мышей, которым инъецировали олигомеры A β 1-42, относительно соответствующего контроля. В данном блоке исследований была определена экспрессия молекул JAM1 и CD31 в гиппокампе мышей в норме и после введения растворимых форм олигомеров A β . Выявлено, что после инъекции A β 1-42 наблюдается статистически достоверное увеличение количества CD31+ клеток в гиппокампе ($5,5 \pm 0,86$) по сравнению с группой контроля ($2,375 \pm 0,35$) ($p=0,0053$). Однако в данных клетках обнаружено снижение колокализации CD31 с белком межклеточных контактов JAM, которая составила ($20,97 \pm 7,02$ %) при введении олигомеров тогда как в контроле наблюдали почти полную колокализацию ($92,7 \pm 5,17$ %) ($p<0,0001$). Таким образом, при моделировании болезни Альцгеймера посредством инъекции олигомеров A β происходит интенсификация гиппокампального ангиогенеза, что соответствует современным представлениям о начальных стадиях нейротоксического действия A β . Вместе с тем, такие вновь формируемые эндотелиальные клетки, выстилающие сосуды, функционально неполноценны из-за снижения экспрессии белка межклеточных контактов JAM1.

Также было выявлено, что при инъекции A β 1-42 происходит статистически значимое увеличение экспрессии алармина HMGB1 ($4,625 \pm 0,57$) по сравнению с группой ложно-оперированных животных с введением PBS ($1,75 \pm 0,4$) ($p=0,0014$), что подтверждает развитие нейровоспаления и определяет возможность вовлеченности в его патогенез рецепторов HMGB1 – RAGE.

Результаты исследования экспрессии RAGE в эндотелиоцитах при моделировании болезни Альцгеймера

В ходе исследования определена интенсивность экспрессии RAGE в зубчатой извилине. Так, экспрессия RAGE у мышей после введения олигомеров A β была значимо выше ($194,15 \pm 22,6$) по сравнению с контролем соответствующего возраста ($105,54 \pm 16,7$) ($p=0,0083$, критерий Манна-Уитни). При определении колокализации сигнала RAGE и маркера эндотелиальных клеток CD31 выявлена сильная степень

колокализации по высокому коэффициенту по Mander's в группе после введения Аβ (0,82±0,12), тогда как в группе после проведения ложной операции такой коэффициент составил (0,24±0,12) ($p=0,0051$, критерий Манна-Уитни).

Таким образом, RAGE белки, экспрессируемые в микрососудах мозга, могут выступать в качестве рецепторов HMGB1, высвобождающегося из поврежденных клетках, и обуславливать повреждение клеток эндотелия с последующей индукцией неангиогенеза, который, носит несовершенный характер и сопровождается нарушениями структурно-функциональной целостности ГЭБ. С учетом того, что васкулярный компонент актуален для формирования микроокружения в нейрогенных нишах головного мозга, такие события могут напрямую приводить к подавлению нейрогенеза при нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с нейровоспалением (экспрессией NLRP3 и соответствующей продукцией IL1β в аффекированных участках гиппокампа).

Таким образом, альтерация и активация глии и повреждение эндотелия церебральных микрососудов объединяются вместе для формирования сложного самоактивирующегося порочного круга, способного приводить к дальнейшей дисфункции нейроваскулярной единицы (НВЕ) при экспериментальной БА (Рисунок 13).

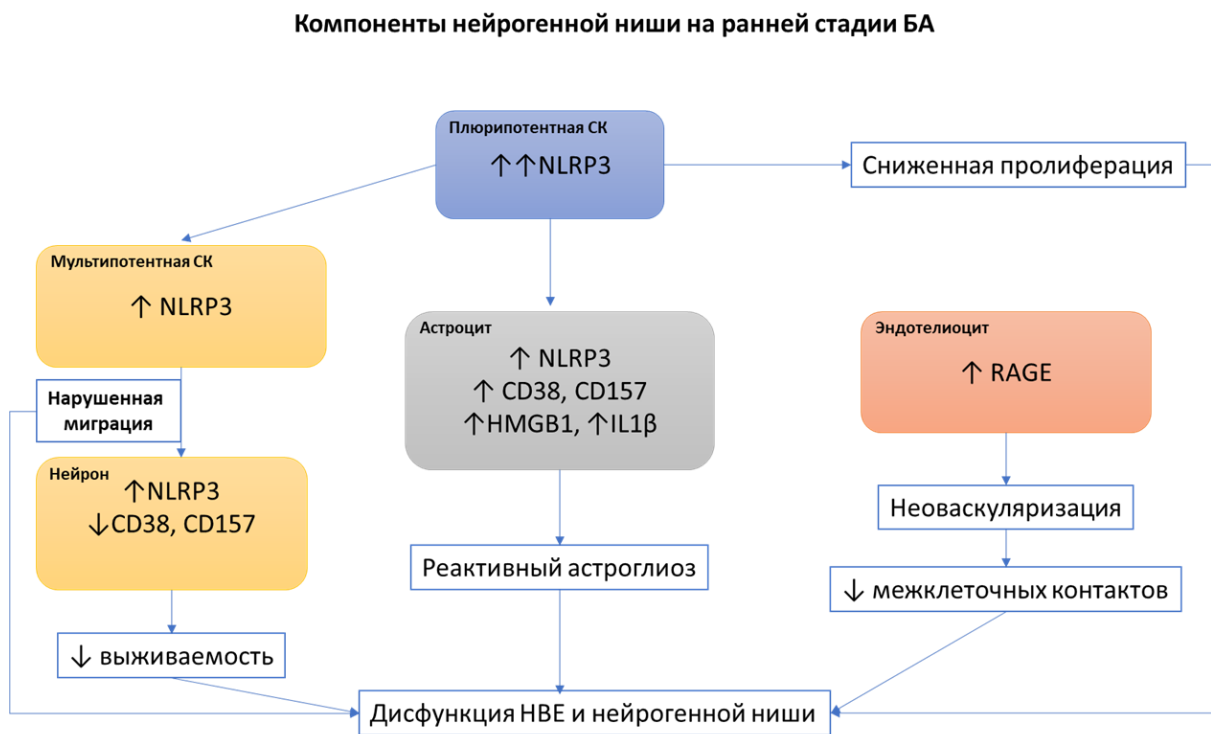


Рисунок 13 – Компоненты нейрогенной ниши на ранней стадии БА.

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

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*^{-/-}, особенно через коллатеральный путь Шаффера; и нарушение синаптической трансдукции в пирамидных клетках, опосредованное затруднением высвобождения нейротрансмиттера из пресинаптического сайта в СА3 зоне гиппокампа.

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.

В данном эксперименте была оценена экспрессия маркеров раннего нейрогенеза у *Nlrp3*^{-/-} мышей. Мы обнаружили, 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 (Рисунок 14).

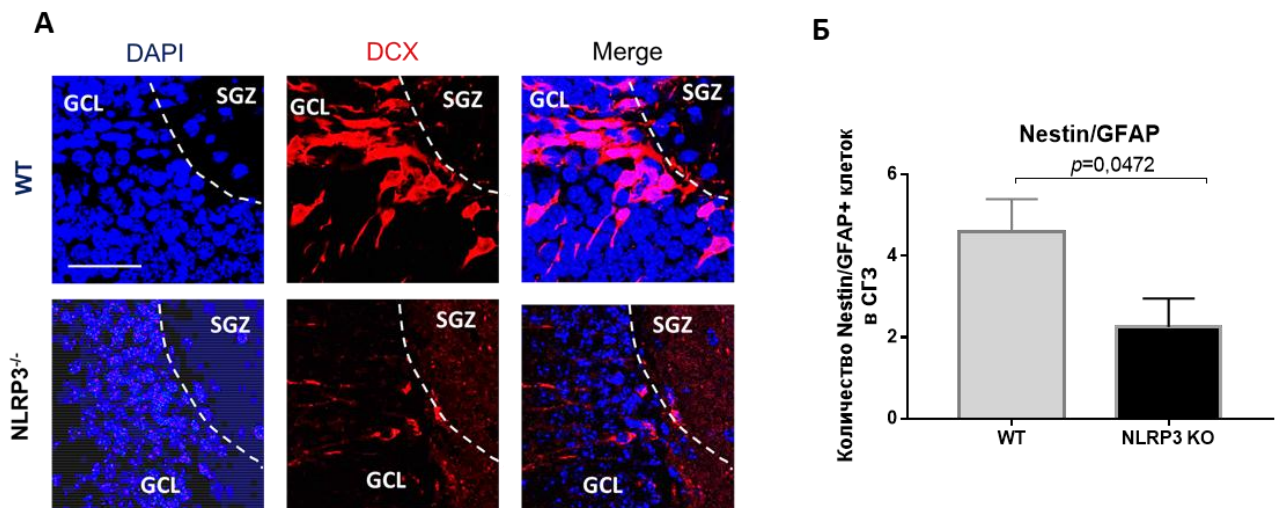


Рисунок 14 – (А) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание зубчатой извилины гиппокампа: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия DCX (красный), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100 мкм. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. (Б) Количество Nestin/GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. WT – контрольные мыши дикого типа, *Nlrp3*^{-/-} – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*.

Следовательно, делеция гена *Nlrp3* приводит к снижению 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. Кроме того, отмечено снижение числа астроцитов в СА1, СА3 зонах гиппокампа и зубчатой извилине, а также изменение их морфологии 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. Таким образом, делеция гена *Nlrp3* приводит к сокращению астроцитов и изменению их морфологии в гиппокампе.

Также в ходе исследования было продемонстрировано, что в отсутствие NLRP3 инфламмасом происходит снижение не только основных маркеров нейрогенеза, отображающих интенсивность данного процесса, но и маркера ангиогенеза VEGF более, чем в 3 раза.

Результаты записи локальных возбуждающих полевых постсинаптических потенциалов (локальных пВПСП)

Известно, что вновь образованные в процессе нейрогенеза нейроны мигрируют в зубчатую извилину гиппокампа, встраиваются в синаптические ансамбли, демонстрируя при этом высокий уровень возбудимости (по сравнению с предсуществующими «старыми» нейронами).

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*.

Было выявлено, что амплитуды пВПСП, вызванные активацией коллатералей Шаффера в аксонах пирамидных клеток зоны СА1 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, $p=0,0369$). 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. Схожие результаты были получены при записи пВПСП, вызванные активацией коллатералей Шаффера в аксонах пирамидных клеток зоны СА3 гиппокампа, у мышей с нокаутированием гена *Nlrp3* и мышей контрольной группы.

Таким образом, данные результаты свидетельствуют о суммарной сниженной активности пирамидных нейронов гиппокампа, более выраженной в СА1 зоне, и о затруднении выделения нейромедиатора из пресинаптических терминалей в синапсах, больше выраженное в СА3 зоне, у *Nlrp3^{-/-}* мышей.

Блок VI. Исследование роли NLRP3 в синаптической передаче в норме и при моделировании болезни Альцгеймера. Влияние NLRP3 инфламмасом на метаболизм глюкозы

В данном блоке была экспериментально подтверждена роль NLRP3 инфламмасом в формировании эмоциональной памяти после инъекции Аβ. Мы обнаружили, что инъекции Аβ 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 (Рисунок 15).

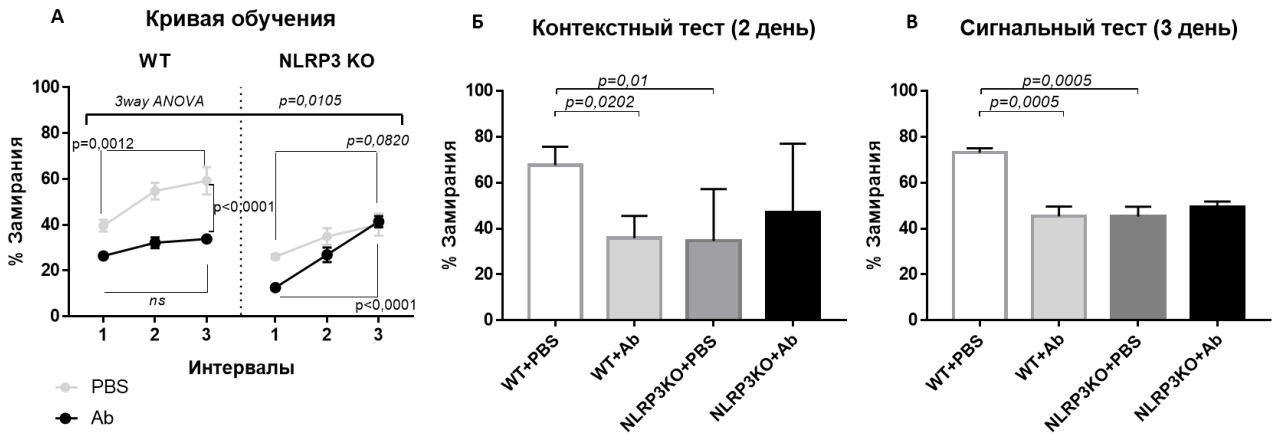


Рисунок 15 – (А) Кривая обучения в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания», ns – незначимо; (Б) Процент замирания во второй контекстный день. (В) Процент замирания в третий сигнальный день. WT – контрольные мыши дикого типа, NLRP3KO – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*. Ab – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

Ранее в исследованиях молекула NLRP3 уже была предложена в качестве молекулы-мишени для терапии БА, однако, оставался до конца неизученным механизм защитного действия [Daniels M.J.D., 2016].

Мы зарегистрировали снижение уровня лактата в ткани гиппокампа у контрольных мышей после введения им олигомеров Аβ, у *Nlrp3*^{-/-} мышей, однако обнаружено, что инъекция Аβ₁₋₄₂ таким мышам не приводит к изменению концентрации лактата в гомогенатах гиппокампа (Рисунок 16А).

Таким образом, снижение уровня лактата в гиппокампе, наблюдаемое в группах контрольных мышей с введением Аβ и в группе мышей, нокаутных по гену *Nlrp3*, подтверждает локальный гипометаболизм глюкозы, характерный для нейродегенерации, что сопровождается ухудшением выполнения поведенческих тестов. Кроме того, полученные данные впервые демонстрируют, что *Nlrp3*^{-/-} фенотип сопровождается снижением продукции лактата в гиппокампе, однако у таких мышей после введения Аβ не наблюдается изменения в экспрессии лактата, что позволяет заключить о индифферентности нокаутирования *Nlrp3* гена по отношению к моделированию нейродегенерации.

При исследовании уровня IL1beta во всех группах NLRP3 нокаутных животных были определены следовые количества IL1beta, что подтверждает отсутствие активности NLRP3 инфламмосом вне зависимости от введения бета-олигомеров (Рисунок 16Б).

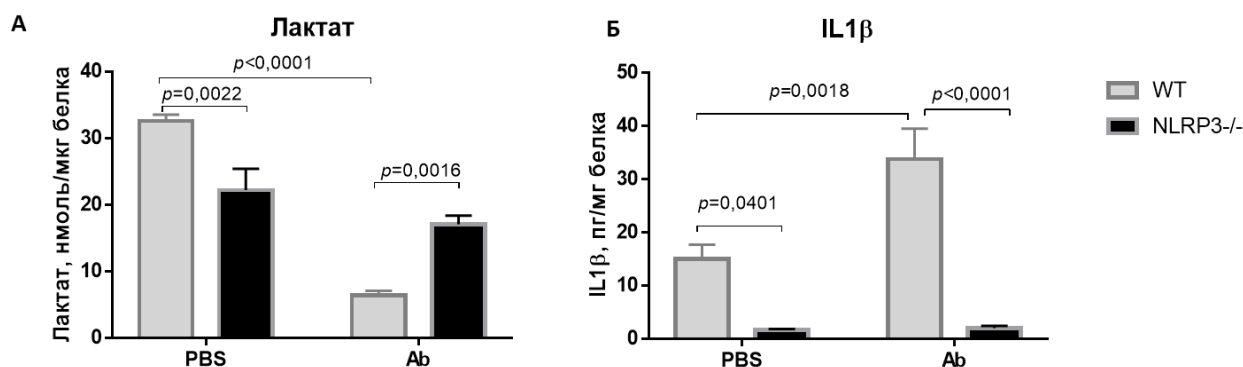


Рисунок 16 – (А) Определение уровня лактата в гомогенатах гиппокампа. (Б) Определение уровня интерлейкина 1 бета в гомогенатах гиппокампа *Nlrp3^{-/-}* – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*. Ab – инъекция бета-амилоида, PBS – инъекция фосфатно-солевого буфера (ложная операция).

Таким образом, 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.

Результаты исследования синаптической передачи у Nlrp3^{-/-} мышей с введением растворимых форм Аβ

Для изучения влияния Аβ и роли NLRP3 инфламмасом на передачу электрофизиологического сигнала проводили изучение синаптической передачи у *Nlrp3^{-/-}* мышей после введения Аβ1-42. 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 (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты исследования синаптической передачи у *Nlrp3^{-/-}* мышей с введением растворимых форм бета-олигомеров.

Зоны гиппокампа	Группы	Контроль		<i>Nlrp3^{-/-}</i>	
		PBS	Аβ1-42	PBS	Аβ1-42
СА1	пВПСП, мВ	0,5±0,1	0,6±0,1	0,9±0,3	0,5±0,1
	Время подъема, мсек	0,95±0,1	0,7±0,1	1,24±0,1	0,98±0,1
	Время спада, мсек	2,4±0,4	1,8±0,2	3,0±0,5	2,1±0,2
СА3	пВПСП, мВ	0,4±0,1	0,5±0,1	0,7±0,1	0,4±0,1
	Время подъема, мсек	0,7±0,1	0,7±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1
	Время спада, мсек	2,0±0,1	2,5±0,3	3,0±0,3	1,8±0,1

Примечание: *p1* – уровень статистической значимости различий относительно показателей группы *Nlrp3^{-/-}* мышей с введением PBS (инъекция фосфатно-солевого буфера – ложная операция); *p2* – уровень статистической значимости различий относительно показателей группы *Nlrp3^{-/-}* мышей с введением Аβ1-42 (инъекция бета-амилоида). пВПСП – амплитуда локальных возбуждающих полевых синаптических потенциалов, *Nlrp3^{-/-}* – мыши нокаутные по гену *Nlrp3*.

Полученные данные свидетельствуют об умеренном нарушении синаптической 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 полученных экспериментальных данных можно заключить, что делеция гена *Nlrp3* обладает протекторным действием в ответ на повреждающее действие олигомеров Аβ 1-42 (Рисунок 17).

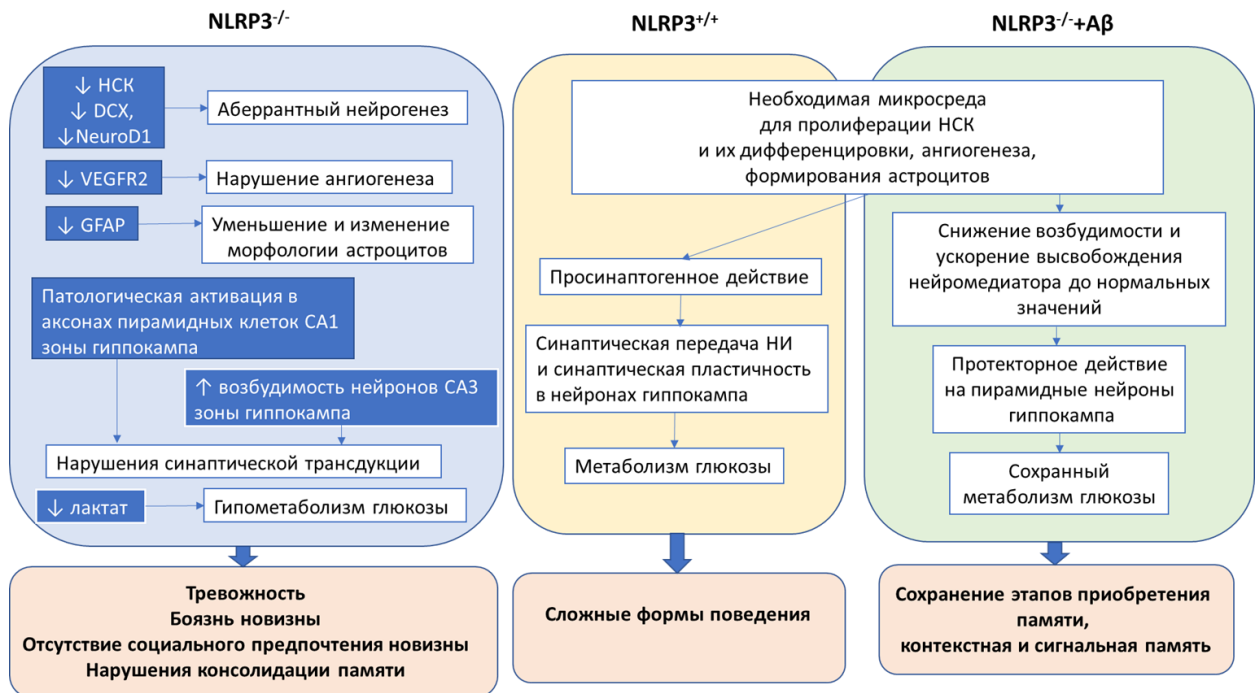


Рисунок 17 – Роль NLRP3 в формировании локального микроокружения в нейрогенной нише в норме и при патологии.

Блок VII. Изучение роли эндогенного газового трансммиттера H₂S в процессах раннего нейрогенеза, формировании клеток астроглиальной природы и экспрессии NLRP3 инфламмасом и провоспалительного цитокина

У мышей, нокаутных по гену *CSE*, происходит нарушение социальной памяти, а также отмечается развитие тревожного типа поведения. В литературе есть лишь единичные сведения о том, что H₂S оказывает влияние на стволовые клетки, однако остается до сих пор неизвестным, как меняется продукция эндогенного H₂S на ранних этапах нейрогенеза по мере «созревания» нейрональных стволовых клеток [Li T., 2017]. 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 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. У мышей, нокаутных по гену *CSE*, наблюдается снижение числа мультипотентных стволовых клеток, а также активированных стволовых

клеток, которые активно пролиферируют относительно контрольных мышей (Рисунок 18).

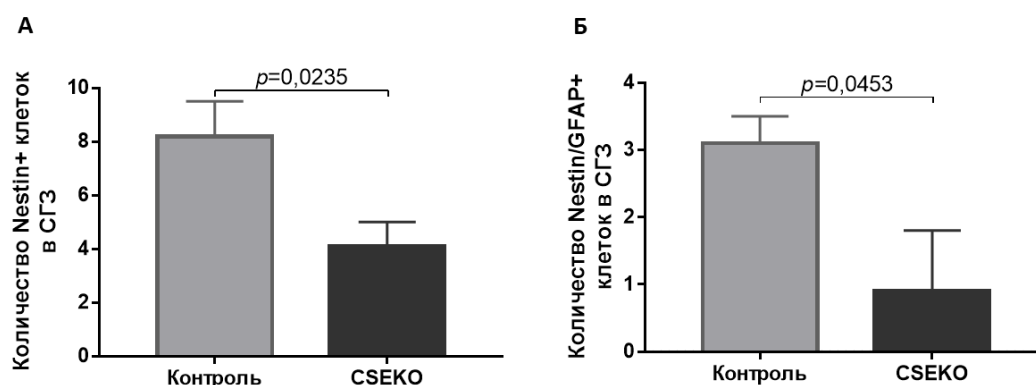


Рисунок 18 – (А) Количество Nestin+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. (Б) Количество Nestin/GFAP+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. WT – контрольные мыши дикого типа, CSEKO – мыши нокаутные по гену *CSE*.

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 трансмисмиттер H_2S можно рассматривать как молекулу, участвующую в формировании микроокружения в нейрогенных нишах.

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

В исследовании была определена экспрессия маркеров воспаления: NLRP3 инфламмасом и провоспалительного интерлейкина IL1 β , продукта активности NLRP3 инфламмасом. Было выявлено, что у *CSE*^{-/-} мышей наблюдается значительное увеличение числа клеток, одновременно локализирующих NLRP3/IL1 β , что проявлялось увеличением коэффициента перекрытия по Mander's в группе *CSE*^{-/-} (0,87 \pm 0,1), в то время как в группе контроля данный показатель был 0,29 \pm 0,1 ($p=0,0193$, критерий Манна-Уитни). 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 19).

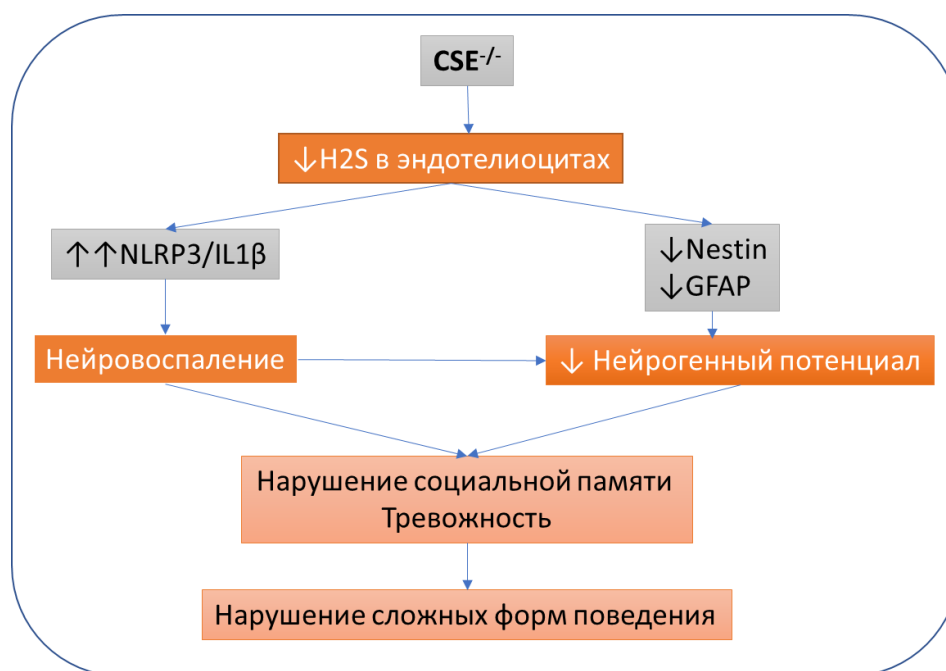


Рисунок 19 – Потенциальная роль CSE/H₂S в нейрогенезе и поведении.

Блок VIII. Результаты исследования роли рецепторов конечных продуктов гликирования белков (RAGE) в процессах нейрогенеза

Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) является полилигандным рецептором, способным связывать не только конечные продукты гликирования, но также алармин HMGB1 и Aβ.

Нами были исследованы маркеры раннего нейрогенеза и нейрональной дифференцировки в гиппокампе *RAGE*^{-/-} мышей. У мышей, с делецией *RAGE* наблюдается снижение пролиферации мультипотентных стволовых клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины, что может приводить к нарушению последующих этапов нейрогенеза. Мы обнаружили, что делеция гена *RAGE* приводит к снижению экспрессии нейробластов, что подтверждает роль RAGE в регуляции нейрогенеза (Рисунок 20).

В совокупности с описанными ранее данными о характере экспрессии HMGB1 и RAGE в васкулярном компоненте нейрогенной ниши, это дает право говорить о том, что опосредованные эндотелиальными RAGE белками механизмы играют роль в прогрессировании хронической нейродегенерации.

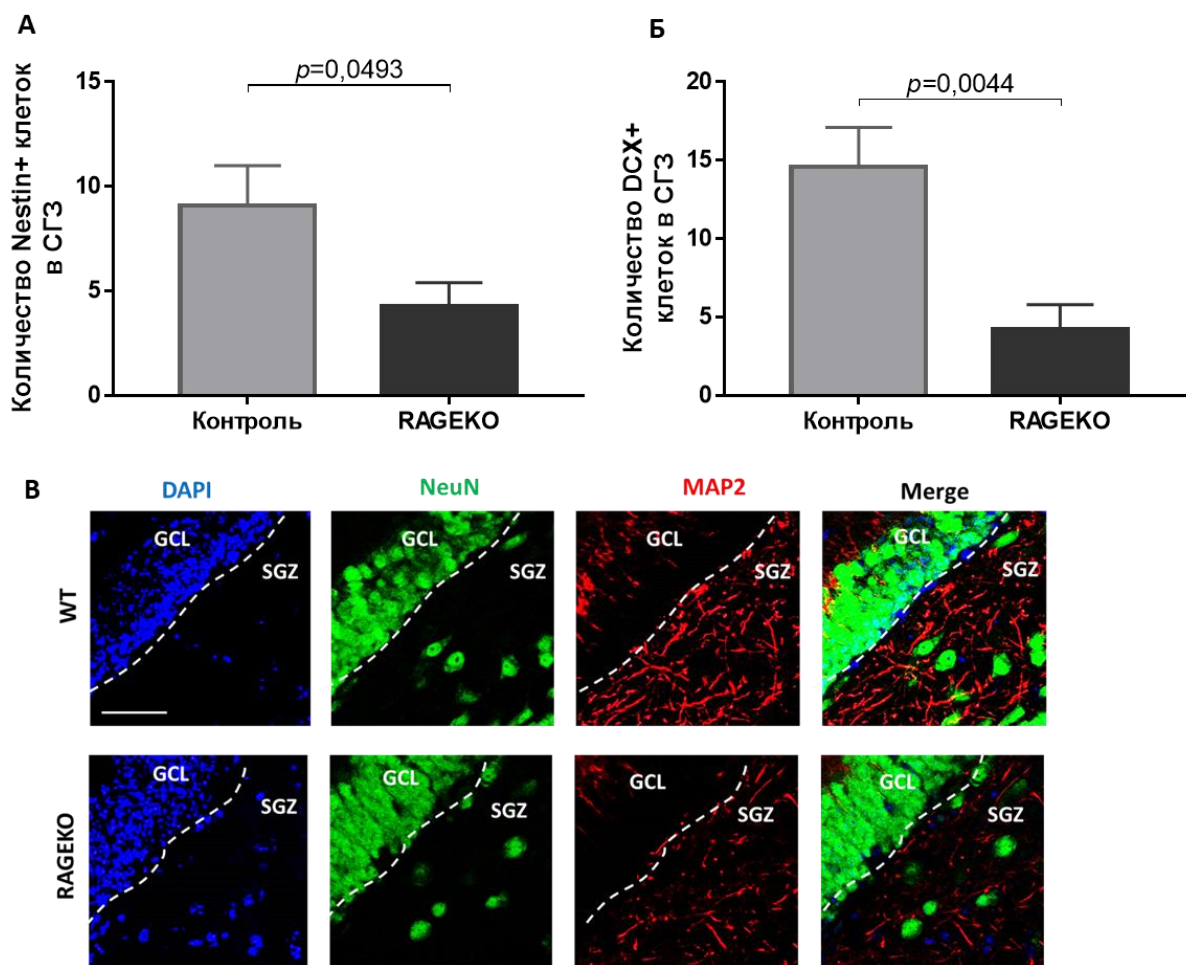


Рисунок 20 – (А) Количество Nestin+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. (Б) Количество DCX+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа в поле зрения. (В) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (синий), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), 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 *RAGE*. GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала 100 мкм.

Блок IX. Результаты создания статической модели нейрогенной ниши

Направленная модуляция активности клеток, формирующих локальное микроокружение – возможный подход к разработке механизмов управления нейрогенезом *in vitro*. В этом контексте, применение оптогенетики для фотоактивации астроцитов является весьма перспективным. 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),

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).

В данном блоке экспериментов было проведено изучение пролиферации нейросфер *in vitro* в физиологических условиях, в условиях при добавлении олигомеров бета-амилоида и при 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 (Рисунок 21).

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, также влияет на клеточный индекс, а именно снижает пролиферативную активность клеток.

Таким образом, с помощью методов отпогенетической фотостимуляции астроцитов возможно управлять пролиферативным потенциалом в нейрогенной нише.

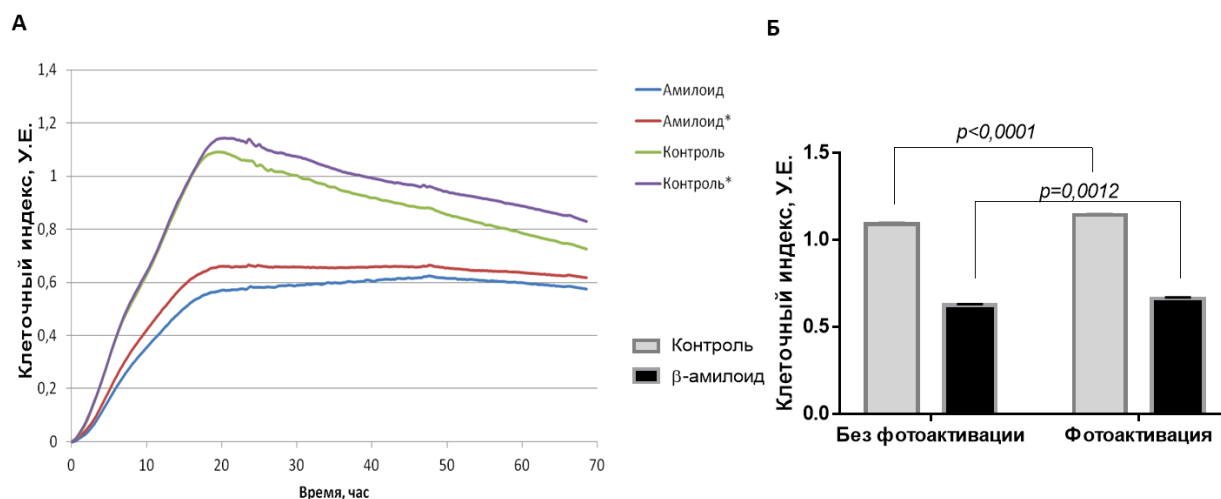


Рисунок 21 – (А) Динамические изменения показателя клеточного индекса в исследуемых группах: Контроль – интактные клетки (сокультура нейросфер с астроцитами); Контроль* – сокультура нейросфер с астроцитами, которые подверглись фотоактивации; Амилоид – нейросферы, культивируемые в присутствии β-амилоида и астроцитов; Амилоид* – нейросферы, культивируемые в присутствии β-амилоида и астроцитов, которые подверглись фотоактивации. (Б) Показатель пролиферативной активности (клеточного индекса) в контрольной и опытной группах клеток (после фотоактивации астроцитов).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нейровоспаление, индуцированное введением растворимых форм Аβ с целью моделирования БА сопровождается явлениями реактивного глиоза (активация клеток астроглии, продукция ими NLRP3 инфламмасом, высвобождением HMGB1, IL1β, 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 NLRP3 инфламмасом в 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 $IL1\beta$ 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 инфламмасы 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/ $IL1\beta$ была установлена в ходе данного исследования. Было 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 основание 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 синаптической 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 сопровождают изменения 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 сниженному 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 транмиттера H_2S , отмечается снижение числа Nestin+ мультипотентных стволовых клеток, а также числа активированных стволовых клеток. Таким образом, CSE и H_2S играют 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/ H_2S пути (нарушение социальной памяти, развитие тревожного типа поведения). Выключение экспрессии RAGE сопровождается подавлением процессов нейрогенеза, нарушением пролиферации нейрональных клеток-предшественников и снижением экспрессии нейробластов, что приводит к нарушению последующих этапов нейрогенеза.

Полученные результаты позволяют предложить схему формирования патологического микроокружения в нейрогенной нише при нейровоспалении, ассоциированном с развитием нейродегенерации (Рисунок 22).

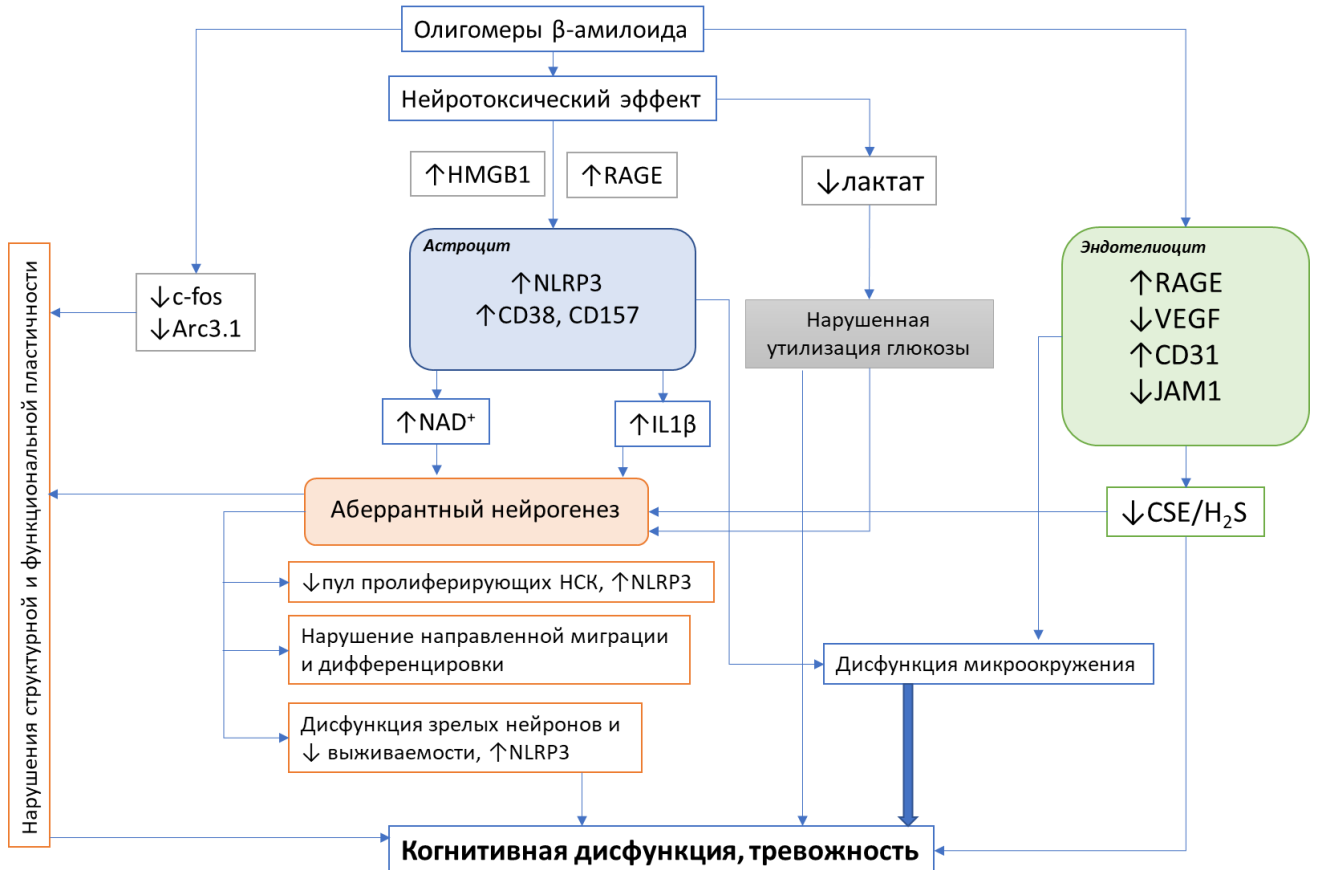


Рисунок 22 – Схема формирования aberrантного локального микроокружения и нейрогенеза при нейровоспалении, ассоциированном с развитием нейродегенерации.

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: снижению 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 нейрогенного микроокружения.

8. Активность астроцитов в нейрогенной нише необходима для поддержания пролиферативной активности клеток при нейродегенерации альцгеймеровского типа: в модели нейродегенерации с применением Aβ1-42 *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 нейрогенеза 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 aberrантного нейрогенеза при нейродегенерации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Молекулы-маркеры активации глии при нейровоспалении: новые возможности для фармакотерапии нейродегенерации / Малиновская Н.А., Прокопенко С.В., Комлева Ю.К., Панина Ю.А., Пожиленкова Е.А., Рябокони Р.В., Салмина А.Б. // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2014. - №5. - С.5-15. ИФ 0,152
2. Эндотелиальные прогениторные клетки в развитии и восстановлении церебрального эндотелия / Салмина А.Б., Моргун А.В., Кувачева Н.В., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Таранушенко Т.Е. // **Современные технологии в медицине**. - 2014. - Т.6. - №4. - С.213-222. ИФ 0,162
3. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга: роль в нейрогенезе и нейровоспалении / Моргун А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Кувачева Н.В., Панина Ю.А., Таранушенко Т.Е., Замай Т.Н., Салмина А.Б. // **Бюллетень сибирской медицины**. - 2014. - №5. - С.138-148. ИФ 0,331
4. Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin 43 story / Salmina A.B., Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Lopatina O.L., Komleva Yu.K., Malinovskaya N.A., Pozhilenkova E.A. // **Reviews in the Neurosciences**. - 2014. - V.25. - №1. - P.97-111. ИФ 3,314
5. Межклеточные взаимодействия при нейродегенерации: новые молекулы-мишени для патогенетической коррекции / Салмина А.Б., Кувачева Н.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Моргун А.В., Пожиленкова Е.А., Лопатина О.Л., Хилажева Е.Д. // Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: Всероссийская конференция с международным участием (Санкт-Петербург, 24-26 июня 2014 года). - Санкт-Петербург, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. - 2014. - С.120.
6. Neuroinflammation and neurogenesis: glial control / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Pozhilenkova E.A., Khilazheva E.D., Kuvacheva N.V., Lopatina O.L., Panina Yu.A. // Abstract book, International Congress on Neuroscience, June 19-21. - Krasnoyarsk, Souvenir. - 2014. - P.85.
7. Воспаление и старение мозга / Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Кувачева Н.В., Лопатина О.Л., Пожиленкова Е.А., Горина Я.В., Гасымлы Э.Д., Панина Ю.А., Моргун А.В., Малиновская Н.А. // **Вестник Российской академии медицинских наук**. - 2015. - №1. - С.17-25. ИФ 0,757
8. Экспрессия молекул CD38 и CD157 в ольфакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера / Комлева Ю.К., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Салмина А.Б. // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2015. - №5. - С.45-49. ИФ 0,188
9. Современные представления о патогенезе болезни Альцгеймера: новые подходы к фармакотерапии (обзор) / Комлева Ю.К., Кувачева Н.В., Лопатина О.Л., Горина Я.В., Фролова О.В., Тепляшина Е.А., Петрова М.М., Салмина А.Б. // **Современные технологии в медицине**. - 2015. - Т.7. - №3. - С.138-148. ИФ 0,184
10. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления / Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Салмин В.В., Лопатина О.Л., Фурсов А.А., Лаврентьев П.В., Белова О.А., Салмина А.Б. // **Вестник Российской академии медицинских наук**. - 2015. - Т.70. - №6. - С.704-713. ИФ 1,544

11. Astroglial control of neuroinflammation: TLR3-mediated dsRNA-sensing pathways are in the focus / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Kuvacheva N.V., Gorina Ya.V., Panina Yu.A., Uspenskaya Yu.A., Petrova M.M., Demko I.V., Zamay A.S., Malinovskaya N.A. // **Reviews in the Neurosciences**. - 2015. - V.26. - №2. - P.143-159. ИФ 3,314
12. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function / Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. // **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. - 2015. - №64. - P.174-184. ИФ 4,240
13. H₂S- and NO-signaling pathways in Alzheimer amyloid vasculopathy: synergism or antagonism? / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Szijarto I.A., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Gertsog G.E., Filipovic M.R., Gollasch M. // **Frontiers in Physiology**. - 2015. - №6. - P.361-365. ИФ 3,500
14. Молекулярные механизмы нейровоспаления и нейрогенеза при болезни Альцгеймера: монография / Комлева Ю.К., Малиновская Н. А., Горина Я. В., Лопатина О. Л., Волкова В. В., Пожиленкова Е. А., Жуков Е. Л., Медведева Н. Н., Салмина А. Б. // Красноярский медицинский университет. - Красноярск : КрасГМУ, 2015. - 165 с. - ISBN 9785942851439
15. Expression of inflammasome in neuronal and astrocytic cells in neurodegeneration / Komleva Y.K., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Volkova V.V., Salmina A.B. // Abstract book Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society. - Goettingen, Neurowissenschaftliche. – 2015
16. CD38 and CD157 Expression: Glial Control of Neurodegeneration and Neuroinflammation / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Malinovskaya N.A., Pozhilenkova E.A., Panina Yu.A., Zhukov E.L., Medvedeva N.N. // *Messenger*. - 2015. - V.3. - P.78-85.
17. Regenerative potential of the brain: composition and forming of regulatory microenvironment in neurogenic niches / Komleva Yu.K., Kuvacheva N.V., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Teplyashina E.A., Pozhilenkova E.A., Zamay A.S., Morgun A.V., Salmina A.B. // **Human Physiology**. - 2016. - V.42. - №8. - P.865-873. ИФ 0,833
18. Экспериментальные модели болезни Альцгеймера: преимущества и недостатки / Иптышев А.М., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Салмина А.Б. // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2016. - №4. - С.5-21. ИФ 0,378
19. Особенности пролиферации и миграции клеток головного мозга при когнитивном тренинге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера / Комлева Ю.К., Горина Я.В., Черных А.И., Лопатина О.Л., Шабалова А.А., Труфанова Л.В., Оловянникова Р.Я., Ендржеевская-Шурыгина В.Ю., Салмина А.Б. // **Бюллетень сибирской медицины**. - 2016. - №6. - С.1-5. ИФ 0,354
20. Endothelial progenitor cells physiology and metabolic plasticity in brain angiogenesis and blood-brain barrier modeling / Malinovskaya N.A., Komleva Yu.K., Salmin V.V., Morgun A.V., Shuvaev A.N., Panina Yu.A., Boytsova E.B., Salmina A.B. // **Frontiers in Physiology**. - 2016. - №7. - P.1-18. ИФ 4,031
21. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain / Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Komleva Yu.K., Salmin V.V., Salmina A.B. // **Reviews in the Neurosciences**. - 2016. - 2016. - P.1-10. ИФ 3,198
22. Молекулярные механизмы нейровоспаления и инсулинорезистентности в ткани головного мозга: учеб. пособие для аспирантов / Малиновская Н. А.,

Комлева Ю. К., Горина Я. В., Лопатина О. Л., Панина Ю. А., Пожиленкова Е. А., Кувачева Н. В., Моргун А. В., Хилажева Е. Д., Успенская Ю. А., Салмина А. Б. // Красноярский медицинский университет. - Красноярск : КрасГМУ, 2016. - 51 с.

23. Features of CD157 and CD38 expression in neurogenic niches of the brain in experimental Alzheimers disease / Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Shuvaev A.N., Malinovskaya N.A., Chernykh A.I., Salmina A.B. // Special Issue: Abstracts of the 95th Annual Meeting of the German Physiological Society, 3–5 March 2016, Lübeck, Germany / Acta Physiologica.-2016. - Vol. 216. - 2016. - P.100.

24. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Черных А.И., Шабалова А.А., Семенчуков А.А., Оловяникова Р.Я., Салмина А.Б. // **Успехи геронтологии.** - 2017. - №1. - С.49-55. ИФ 0,530

25. Поведенческий фенотипический анализ животных с генетической моделью болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Биомедицина.** - 2017. - №3. - С.47-59. ИФ 0,476

26. CD38/CD157 and aberrant behavior in neurodegeneration and neuroinflammation / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Chernykh A.I., Panina Yu.A., Iptyshev A.M., Pozhilenkova E.A., Belova O.A., Malinovskaya N.A. // Abstracts of the Brainstorming Meeting in CD38 & CD157. - San Benedetto Po & Mantova, Italy, F. Costa. - 2017. - P.38.

27. Аберрантная активность глии в нейроваскулярной единице головного мозга при нарушениях его развития и нейродегенерации / Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Моргун А.В., Писарева Н.В., Хилажева Е.Д., Горина Я.В., Шуваев А.Н., Панина Ю.А., Бойцова Е.Б., Малиновская Н.А., Тохидпур А.-., Пожиленкова Е.А. // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. - Воронеж, Истоки. - 2017. - С.683-684.

28. Role of CD38 and CD157 in the regulation of adult neurogenesis / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Chernykh A.I., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Pozhilenkova E.A. // Abstracts of the 4th Summit for Child Mental Development. - Kanazawa (Japan), Kanazawa University. - 2017. - P.11.

29. Impaired glucose metabolism in the brain depends on the nature of the activation and damage of astroglial cells and dysregulated neurogenesis / Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Chernykh A.I., Salmina A.B. // Proceedings 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society. - Göttingen, Neuroforum. - 2017. - P.585.

30. Роль нейровоспаления в реализации когнитивных функций и социального взаимодействия у мышей с возраст-зависимой нейродегенерацией / Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** - 2018. - Т.12. - №2. - С.27-32. ИФ 0,566

31. Ранние изменения в гиппокампальном нейрогенезе, индуцированные растворимыми формами олигомеров Ab1-42 / Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Горина Я.В., Черных А.И., Шуваев А.Н., Салмина А.Б. // **Биомедицинская химия=Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.** - 2018. - Т.64. - №4. - С.326-333. ИФ 0,860

32. Современные технологии культивирования стволовых клеток головного мозга / Комлева Ю.К., Осипова Е.Д., Моргун А.В., Тепляшина Е.А., Салмин В.В., Малиновская Н.А., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. // **Цитология.** - 2018. - Т.60. - №8. - С.587-597. ИФ 0,575

33. Excitation/inhibition imbalance and impaired neurogenesis in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders / Lopatina O.L., Malinovskaya N.A., Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Shuvaev A.N., Olovyannikova R.Ya., Belozor O.S., Belova O.A., Higashida H., Salmina A.B. // **Reviews in the Neurosciences**. - 2019. - V.1. - №1. - P.1-10. ИФ 2,157

Список сокращений

5xFAD	–	семейная (генетическая) форма болезни Альцгеймера
CD	-	кластер дифференцировки
CSE	–	цистатинин-γ-лиаза
DAMPs	–	молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями, молекулярные структуры, связанные с опасностью
GFAP	–	глиальный фибриллярный кислый белок
H ₂ S	–	сероводород
HMGB1	–	(англ. high-mobility group protein B1) — белок из группы ядерных негистоновых белков HMG
IL1β, ИЛ1β	–	интерлейкин 1 бета
NLRP3	–	NLRP3 инфламмосомы (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3)
PBS	–	фосфатно-солевой буфер
RAGE	–	рецептор конечных продуктов гликирования
TLR	–	toll-подобные рецепторы
Aβ1-42	–	бета-амилоид 1-42
БА	–	болезнь Альцгеймера
ВЛМ	–	водный лабиринт Морриса
ГЭБ	–	гематоэнцефалический барьер
иСМЖ	–	искусственная спинномозговая жидкость
НВЕ	–	нейроваскулярная единица
НСК	–	нейрональные стволовые клетки
пВПСП	–	полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы