

На правах рукописи



Баширзаде Алим Асиф оглы

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ
РАЗВИТИЯ И КОРРЕКЦИИ КОГНИТИВНЫХ ДЕФИЦИТОВ НА
НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА
У МЫШЕЙ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (г. Новосибирск)

Научный руководитель:

Амстиславская Тамара Геннадьевна – доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией трансляционной биопсихиатрии ФГБНУ «НИИ нейронаук и медицины» (г. Новосибирск)

Официальные оппоненты:

Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии отдела молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» (г. Москва)

Иванова Светлана Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной генетики и биохимии Научно-исследовательского института психического здоровья Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск)

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится 4 апреля 2023 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.242.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2. Тел. 8(383)-333-64-56

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте <https://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Пальчикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. С увеличением продолжительности жизни населения резко возросла распространенность тяжелых когнитивных дефицитов, вызванных нейродегенеративными заболеваниями, поэтому в настоящее время деменция пожилых лиц является одной из актуальнейших проблем современной медицины, отмеченной в программе ВОЗ по заполнению пробелов в области охраны психического здоровья (mhGAP). Наиболее частой причиной деменции в пожилом возрасте является болезнь Альцгеймера (БА) (60-70% всех случаев). На сегодняшний день не существует эффективных методов лечения БА, а используемые лишь снижают выраженность симптомов. Успех терапии БА напрямую связан с углубленным пониманием нейрофизиологических и молекулярно-генетических механизмов, определяющих это заболевание (Тихонова, 2018).

Моделирование БА представляет собой весьма нетривиальную задачу. Существующие нейротоксические модели БА основаны на центральном введении различных фрагментов амилоида в головной мозг мышей. Актуальным и нерешенным вопросом остается определение предпочтительной области введения амилоидных фрагментов в мозг, в зависимости от чего могут быть запущены разные патофизиологические процессы, вовлеченные в когнитивные нарушения, такие как особенности накопления эндогенного A β , течение воспалительной реакции и аутофагии.

Аутофагия представляет собой физиологический процесс внутриклеточной деградации в аутолизосомах частично денатурировавших белков, а дефекты в системе аутофагии являются важными звеньями амилоидного каскада и патогенеза БА (Espinet et al., 2015). Стимуляция аутофагосомного и лизосомального потоков может рассматриваться как перспективный терапевтический подход в лечении БА. Рапамицин как индуктор mTOR-зависимого пути и трегалоза как индуктор mTOR-независимого пути обладают разными механизмами активации аутофагии, но как эти два сигнальных пути будут модулировать аутофагический ответ еще предстоит выяснить.

Еще одним перспективным направлением в поиске новых терапевтических подходов БА является патогенетическая терапия молекулами, имеющими в составе бета-лактамовое кольцо. Цефтриаксон (Цеф) – цефалоспориновый антибиотик III поколения продемонстрировал способность восстанавливать когнитивные дефициты у мышей на фармакологической модели болезни Паркинсона и у крыс OXYS, представляющих селекционную модель спорадической формы БА (Puryshev et al., 2019). Вопрос о способности Цеф снижать накопление амилоида и показатели нейровоспаления, восстанавливать различные типы когнитивных нарушений у мышей на нейротоксической модели БА остается открытым.

Степень разработанности темы исследования. Олигомеры A β вызывают различные типы синаптических дефектов, что в конечном итоге приводит к гибели нейронов и клинической картине деменции. Введение олигомеров ами-

лоида бета, полученные из фрагмента 25-35 (A β O25-35) в боковые желудочки головного мозга крыс вызывало нарушение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (Delobette et al., 1997).

Процесс аутофагии регулируется mTOR (mammalian target of rapamycin)-зависимым и mTOR-независимым путями, которые поддаются химическим воздействиям (Sarkar, 2013). Было идентифицировано несколько небольших молекул, модулирующих аутофагию, имеющие потенциальное терапевтическое применение при БА. Показано, что в культуре клеток трегалоза снижала секрецию A β , тормозила деградацию APP и его C-концевого фрагмента в эндолизосомном компартменте (Tien et al., 2016). На трансгенной модели гиперэкспрессии белка предшественника A β у мышей длительное лечение рапамицином снижало уровень патогенного белка и восстанавливало когнитивные реакции запоминания и обучения (Spilman et al., 2010).

Патогенез БА включает нейровоспаление, сопровождающееся эксайтотоксичностью глутамата. Показано, что Цеф снижает глутаматную эксайтотоксичность, модулируя экспрессию глутаматного транспортера GLT-1 (Zumkehr et al., 2015). Известны данные клинических испытаний Цеф в качестве нейропротекторного средства при боковом амиотрофическом склерозе или деменции при болезни Паркинсона (Cudkowicz et al., 2014).

Цель работы: исследование патофизиологических и патоморфологических коррелятов когнитивных дефицитов и методов их коррекции индукторами аутофагии и цефтриаксоном у мышей с центральным введением олигомеров амилоида бета.

Задачи:

1. Сравнить когнитивные дефициты, накопление A β , показатели нейровоспаления, плотность нейронов и активацию аутофагии в структурах головного мозга у мышей C57BL/6 при введении олигомеров амилоида бета (A β O25-35) в боковые желудочки мозга или в гиппокамп.
2. Исследовать когнитивные дефициты, накопление A β , плотность нейронов, активацию микроглии во фронтальной коре, миндалевидном комплексе и гиппокампе (CA1, CA3 области, зубчатая извилина) мышей при индукции mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии после центрального введения A β O25-35.
3. Оценить когнитивные дефициты, накопление A β , плотность нейронов, активацию микроглии во фронтальной коре и гиппокампе (CA1, CA3 области, зубчатая извилина) мышей при патогенетической коррекции цефтриаксоном после центрального введения A β O25-35.

Научная новизна. Получены новые данные о развитии нейровоспаления при интрацеребровентрикулярном (ИЦВ) и интрагиппокампальном (ИГ) введении A β O25-35. При ИЦВ введении A β O25-35 происходит активация экспрессии генов провоспалительных маркеров: гена маркера активации астроглии *Lcn2* и гена маркера активации микроглии *Aif1* в гиппокампе и миндалине. Оценен вклад совместной активации аутофагии в коррекцию когнитивных нарушений на нейротоксической модели БА у мышей. Впервые показан положительный

кумулятивный эффект индукторов mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии на анксиогенный эффект введения A β O25-35 и его отсутствие на когнитивные функции. Изолированная активация mTOR-зависимой аутофагии рапамицином и mTOR-независимой аутофагии трегалозой приводила к снижению накопления A β , инактивации микроглии в структурах мозга, повышению латентного времени перехода в тесте пассивного избегания, что свидетельствует о восстановлении когнитивных дефицитов на нейротоксической модели БА. Выявлены новые аспекты воздействия цефтриаксона в восстановлении нарушенных A β O25-35 когнитивных функций и показателей нейровоспаления, заключающиеся в восстановлении пространственной памяти, снижении показателя клеточной адгезии CD54 во фронтальной коре и гиппокампе мышей.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Выявленные в настоящей работе специфические особенности проявления воспалительной реакции и аутофагии после введения A β O25-35 в боковые желудочки и в область гиппокампа способствуют более глубокому пониманию течения и взаимодействия патофизиологических процессов при нейродегенеративных заболеваниях. Обнаруженные в работе позитивные эффекты применения индукторов аутофагии и цефтриаксона могут являться экспериментальным обоснованием возможности разработки новых подходов лечения БА в клинике.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа проделана на базе Института нейронаук и медицины. Экспериментальное исследование выполнено на лабораторных мышах линии C57BL/6, которые, после центрального введения им олигомеров амилоида бета, представляют собой модель патофизиологических процессов, происходящих при БА. Методологическую основу работы составляют методы автоматизированного поведенческого анализа, нейроморфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований, а также анализа и синтеза информации из научной литературы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Введение A β O25-35 как в боковые желудочки, так и в гиппокамп мышам C57BL/6 нарушает долговременную ассоциативную память о страхе, увеличивает накопление амилоида, активирует микроглию в различных структурах мозга. Внутрижелудочковое, но не внутригиппокампальное введение вызывает повышение экспрессии гена маркера активации астроглии *Lcn2* и гена маркера активации микроглии *Aif1* в гиппокампе и миндалине.
2. Активация как mTOR-зависимой (рапамицин), так и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии восстанавливает когнитивные нарушения у мышей с введением A β O25-35 в боковые желудочки, снижает накопление A β , активацию микроглии в структурах мозга мышей.
3. Цефтриаксон снижает нейровоспаление, накопление A β в структурах мозга, восстанавливает когнитивные нарушения, обусловленные внутрижелудочковым введением A β O25-35.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством экспериментального материала, применением современных методов исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам, а также выбором адекватных критериев статистической обработки результатов. Основные результаты по теме диссертационного исследования представлены и обсуждены на внутри- и межлабораторных семинарах Научно-исследовательского института нейронаук и медицины, а также на Российской конференции с международным участием «Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддиктивных расстройств» (г. Томск, 2020), III Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (г. Новосибирск, 2022), 13-ой Международной мультиконференции «Биоинформатика регуляции генома и структурная/системная биология» (г. Новосибирск, 2022).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (в том числе 3 публикации в журналах, индексируемых Scopus, Web of Science), 5 публикаций в сборниках международных, всероссийских и региональных научно-практических конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 22 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель содержит 228 источников.

Вклад автора. Основные результаты были получены автором самостоятельно. Личный вклад автора диссертации заключается в непосредственном планировании и постановке экспериментальных серий, интерпретации и обсуждении результатов, написании отчетов и статей. Самостоятельно были произведены стереотаксические введения Аβ, проведены поведенческие тесты, выполнен анализ данных с помощью статистических методов, построены графики с помощью программного кода на R. Совместно с д.б.н. Беличенко В.М. определены уровни экспрессии генов, совместно с м.н.с. Акопян А.А. и к.б.н. Овсюковой М.В. проведены иммуногистохимические и нейроморфологические исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и экспериментальные группы. Экспериментальные процедуры проведены в соответствии с рекомендациями руководства по уходу и использованию лабораторных животных Института исследований лабораторных животных и одобрены локальным этическим комитетом НИИНМ. В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 (возраст 2 мес., 20–25 г),

полученных из вивария НИИНМ. Животных содержали в стандартных условиях (цикл свет-темнота: 14 ч света и 10 ч темноты, температура: 20–22 °С, относительная влажность: 50–60%), со свободным доступом к воде и корму. Все манипуляции выполняли в световой фазе цикла дня. Мыши содержались по 5-6 особей в клетке.

В эксперименте № 1, посвященному анализу поведения, нейроморфологическим и нейрофизиологическим коррелятам при введении АβO25-35 в боковые желудочки и в гиппокамп головного мозга мыши были разделены на 5 групп (n=15 для каждой группы): 1) «Интактные» - мыши, которым не производилась инъекция; 2) «Раст_ИЦВ» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки головного мозга; 3) «Раст_ИГ» - двухстороннее введение растворителя в область зубчатой извилины гиппокампа; 4) «Аβ_ИЦВ» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки головного мозга; 5) «Аβ_ИГ» - двухстороннее введение АβO25-35 в область зубчатой извилины гиппокампа. Через 1 месяц после центрального введения АβO25-35 тестировали поведение в тестах открытого поля и пассивного избегания в течение недели. На следующий день биопробы забирали на определение генной экспрессии (n=10) и иммуногистохимическое исследование (n=5).

В эксперименте № 2 оценивали эффекты активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии. Мыши были разделены на семь групп (n=10–17 для каждой группы): 1) «Контроль» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки головного мозга (ИЦВ); 2) «Аβ» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки; 3) «Аβ_Трег» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки и ежедневное потребление 2% раствора трегалозы с питьевой водой; 4) «Аβ_Рап» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки и введение 10 мг/кг рапамицина, внутрибрюшинно (в/б), 7 раз через день; 5) «Аβ_Рап_Трег» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки, введение 10 мг/кг рапамицина, в/б, 7 раз через день и ежедневное потребление 2% раствора трегалозы с питьевой водой; 6) «Аβ_Рап_Трег_3-МА» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки, введение 10 мг/кг рапамицина, в/б, 7 раз через день, ежедневное потребление 2% раствора трегалозы с питьевой водой и введение 3-метиладенина 15 мг/кг, в/б, 7 раз через день, за 1 ч до введения рапамицина; 7) «Аβ_3-МА» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки и введение 3-метиладенина 15 мг/кг, в/б, 7 раз через день. Применение рапамицина, трегалозы или 3-метиладенина начинали через 2 дня после стереотаксической операции в течение 2 недель. Спустя сутки после последнего введения препарата с 16-ого по 30-й день проводили поведенческое тестирование. На 32 день производили забор биологического материала для анализа экспрессии генов (n=5-12) и нейроморфологического исследования (n=5).

В эксперименте № 3 исследовали эффекты цефалоспоринового антибиотика цефтриаксона на когнитивные дефициты, накопление Аβ, показатели нейровоспаления, плотность нейронов у мышей с центральным введением АβO25-35 в боковые желудочки мозга. Мышей делили на четыре группы (n=15–20 в

каждой): 1) «Раст_Физ» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки головного мозга и в/б введение физиологического раствора (0,9 % раствор NaCl); 2) «Раст_Цеф» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки и в/б введение Цеф (100 мг/кг/день); 3) «Аβ_Физ» - двухстороннее введение АβO25-35 и в/б введение физиологического раствора; 4) «Аβ_Цеф» – двухстороннее введение АβO25-35 и в/б введение Цеф. Стереотаксическая операция была проведена мышам в день 0. Физ. раствор и цефтриаксон вводили в течение 36 дней, начиная со 2-ого дня после стереотаксической операции. Часть мышей (n=7–8) из каждой группы тестировали в установке Intellicage с 1-ого по 28-й день. Остальных мышей (n=8–16) тестировали в Т-образном лабиринте, тесте открытого поля и тесте пассивного избегания через 2 недели после операции (ИЦВ введение АβO25-35, день 0). Т-образный лабиринт на 15-17 день, тест «Открытое поле» в день 27 и тест пассивного избегания на 34–36 дни. На 37 день были взяты биологические образцы для нейроморфологического и иммуногистохимического исследований (n=5).

Введение АβO25-35 в головной мозг мышей. Олигомеры бета-амилоидных фрагментов человека АβO25-35 вводили билатерально в боковые желудочки по 5 мкг в 5 мкл (ИЦВ), либо в гиппокамп по 2,5 мкг в 2,5 мкл (ИГ) с помощью моторизованного стереотаксиса Neurostar Stereo Drive (Neurostar, Германия). Координаты введения в желудочек: AP=-0,46 мм, ML=±0,9 мм, DV=2,5 мм. Координаты введения в гиппокамп: AP = -2,06 мм, ML = ± 1,3 мм, DV = 2 мм (Song et al., 2016).

Тестирование поведения животных. Тест пассивного избегания проводили в соответствии с протоколом (Dubrovina et al, 2005) в системе GEMINI™ Avoidance System (San Diego Instruments, США). 1-й день - габитуация; 2-й день - обучение (при заходе в темный отсек мышь получала удар током силой 0,5 мА); 3-й день - тестирование (в течение 3 минут, регистрировали латентное время перехода в темный отсек). В качестве показателя памяти, обусловленной боязнью наказания, использовали латентное время перехода в темное помещение в день обучения и в день тестирования.

Тест «Открытое поле». Этот тест проводился согласно протоколу (Pupyshev et al., 2019). Исследовали общую двигательную активность (пройденное расстояние, см), тревожность (время нахождения в центре арены, с), исследовательское поведение (количество вертикальных стоек, n) и эмоциональность (количество актов дефекации, n).

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» выполняли в соответствии с протоколом (Walf and Frye, 2007) с небольшими изменениями. Мышь помещали на центральную платформу носом к закрытому рукаву и записывали ее поведение в течение 5 минут. Тревожность оценивали по времени, проведенному в открытых рукавах.

Т-образный лабиринт проводили по протоколу спонтанных чередований (Deacon and Rawlins, 2006). Процент правильных выборов принимался за показатель рабочей памяти.

Поведение животных в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Г-образный лабиринт» регистрировали с помощью боковой и верхней цифровых видеокамер, а обработку и анализ видеозаписей проводили с помощью программного обеспечения EthoVision XT 10.1 (Noldus, Нидерланды).

Система Intellicage (TSE System, Германия) была использована для анализа условной реакции предпочтения места, переучивания реакции предпочтения места, условной реакции избегания места, угашения условной реакции избегания, патрулирования у мышей в соответствии с протоколом (Kiryk et al., 2020).

Для нейроморфологического исследования мышей усыпляли в камере с CO₂. Транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем 4% параформальдегидом в PBS. Мозг быстро удаляли и постфиксировали в PBS, содержащем 30% сахарозы, при 4°C. После погружения в заливку Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США), мозг замораживали и хранили при температуре -70 C до разделения на коронарные срезы вдоль лобной коры или гиппокампа мозга толщиной 30 мкм на криостате HistoSafe MicroCut – SADV (Китай). Окрашивание по Нисслю проводили по стандартной процедуре (Paxinos and Franklin, 2019). Изображение было получено и проанализировано с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония), соединенного с камерой Nikon DS-Fi2 (Nikon, Япония) и программным обеспечением Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, CA, США). Плотность нейронов измеряли полуколичественным методом (Tikhonova et al., 2017).

Иммуногистохимическое исследование проводили по протоколу (Puryshev et al., 2019). Флюоресцентные изображения были получены с помощью микроскопа AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Германия) и затем проанализированы в программном обеспечении Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, CA, USA). Интенсивность флюоресценции, связанную с экспрессией специфических белков, измеряли как оптическую плотность с поправкой на фон, с вычитанием сигналов окрашивания неиммунореактивных областей на изображениях, преобразованных в оттенки серого.

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ПЦР методом построения стандартной кривой (Ginzinger, 2002). Относительное количество тестируемой комплементарной ДНК (кДНК) определяли с использованием калибровочных кривых, полученных из разведений стандартной кДНК. Значение экспрессии для целевого гена нормализовали к среднему геометрическому уровню мРНК референсных генов.

Статистический анализ. Данные анализировали с помощью пакета программ Statistica v.10 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения данных определяли с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Данные с нормальным распределением анализировали с помощью F критерия Фишера, t критерия Стьюдента с поправками Бонферрони в случае множественных сравнений. Апостериорные post hoc тесты применялись в модификации по Тьюки и LSD-тест. Данные с ненормальным распределением анализировали с помощью H

критерия Краскела-Уоллиса, U-критерия Манна–Уитни с поправками Бонферрони в случае множественных сравнений. Коэффициенты корреляции рассчитаны по методу Спирмена. Коробчатые диаграммы построены с помощью программного кода на R и представлены в виде боксов с усами. Столбчатые диаграммы представлены в виде среднего \pm ошибка среднего. Статистически значимым считали уровень $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнение когнитивных дефицитов, накопления A β , показателей нейровоспаления, плотности нейронов, активации аутофагии в структурах мозга мышей при введении A β O25-35 в боковые желудочки мозга или в гиппокамп

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора введения амилоида на латентное время перехода в темный отсек в день тестирования ($F(1,63) = 77,71, p < 0,001$), но не влияние фактора места инъекции амилоида ($F(1,63) = 0,8, p > 0,05$) и взаимодействия факторов ($F(1,63) = 0,13, p > 0,05$). У мышей, составляющих группы с амилоидом («A β _ИЦВ» и «A β _ИГ») показан дефицит воспроизведения реакции в день тестирования (Рис. 1) по сравнению с соответствующими группами растворителя («Раст_ИЦВ» и «Раст_ИГ»), согласно *post hoc* тесту по Тьюки. Таким образом, мыши, получавшие A β O25-35, независимо от области введения, хуже формировали ассоциацию между контекстом экспериментальной установки и опасностью темного отсека, где они накануне получали болезненное наказание.

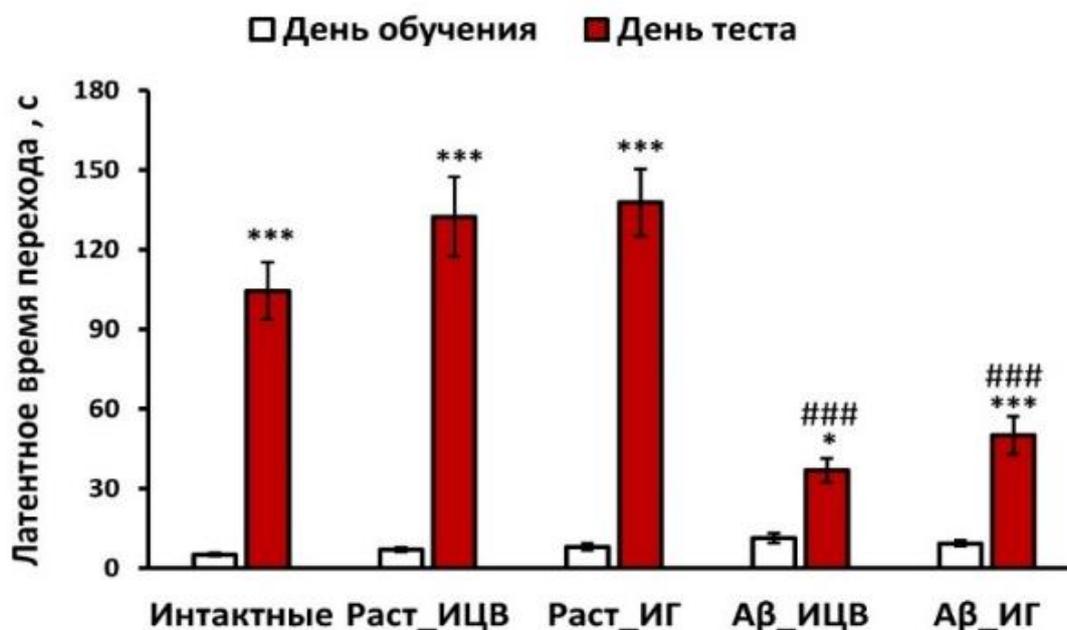


Рисунок 1. Влияние введения A β O25-35 ИЦВ или ИГ на показатель памяти и обучения в тесте условного пассивного избегания у мышей C57BL/6. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по сравнению с уровнем в день обучения; ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст_ИЦВ» и «Раст_ИГ»).

Нарушение поведения у мышей с введением амилоида (группы «Аβ_ИЦВ» и «Аβ_ИГ») сопровождалось увеличением накопления амилоида не только в исследованных областях гиппокампа, но и во фронтальной коре, куда амилоид не вводили (Рис. 2). Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым именно неокортекс является областью, в которой раньше всего начинают откладываться отложения Аβ (Thal et al, 2002).

Показаны межгрупповые различия между экспериментальными группами в СА1 зоне гиппокампа ($F(4,14) = 12,17, p < 0,001$), СА3 зоне гиппокампа ($F(4,14) = 12,54, p < 0,001$), зубчатой извилине гиппокампа ($F(4,14) = 6,38, p < 0,01$), во фронтальной коре ($F(4,14) = 29,35, p < 0,001$).

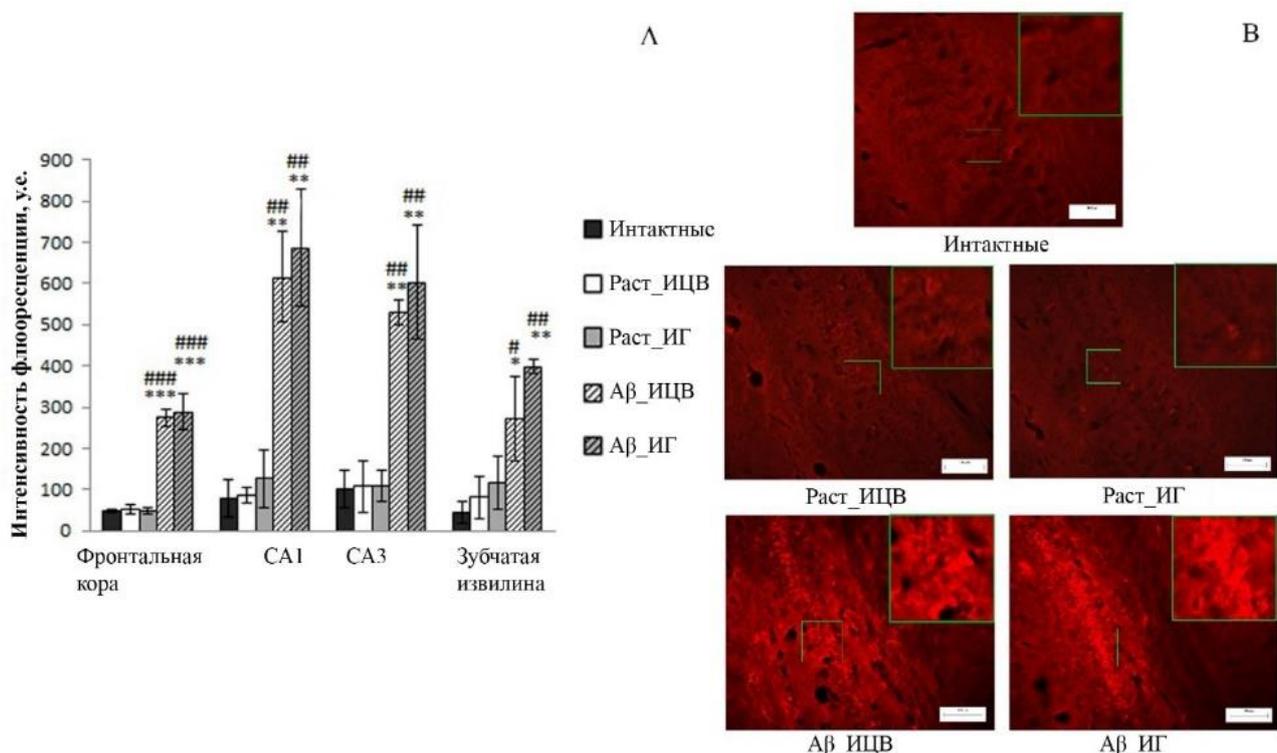


Рисунок 2. Влияние ИЦВ или ИГ введения Аβ₂₅₋₃₅ на накопление Аβ во фронтальной коре, зонах СА1, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа головного мозга мышей линии C57BL/6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «Интakтные»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст_ИЦВ» и «Раст_ИГ»).

Накопление Аβ положительно коррелировало с активацией микроглии в виде увеличения экспрессии белка IBA1 в зоне СА1 гиппокампа ($r_s = 0,72, p < 0,01$) и во фронтальной коре ($r_s = 0,8, p < 0,001$) мышей, которым центрально вводили Аβ₂₅₋₃₅ (Рис. 3), что свидетельствует о развитии нейровоспаления в исследованных областях.

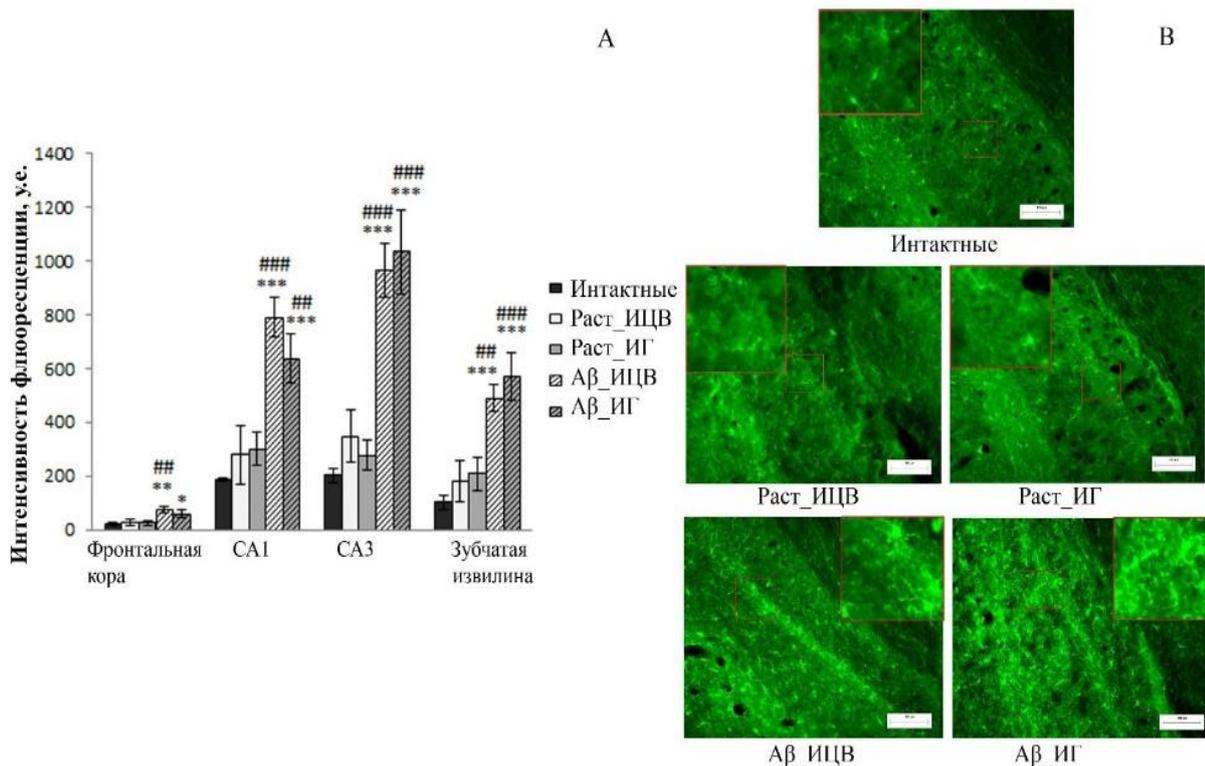


Рисунок 3. Влияние ИЦВ или ИГ введения Аβ₀₂₅₋₃₅ на активацию микроглии во фронтальной коре, зоне СА1, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа мышей C57BL/6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ по сравнению с группой «Интakтные»; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст_ИЦВ» и «Раст_ИГ»).

Данное заключение подтверждается увеличением в миндалине экспрессии гена *Aif1*, а в гиппокампе гена *Lcn2* в группе с ИЦВ введением амилоида («Аβ_ИЦВ») по сравнению с интактными животными (Рис. 4). Увеличение содержания липокалина 2 ассоциируется с вовлечением астроцитов в воспалительные процессы (Mesquita et al, 2014), а также эпителия хориоидного сплетения в желудочках мозга и, вероятно, обеспечивающего повышение уровней мРНК гена *Lcn2* при ИЦВ введении.

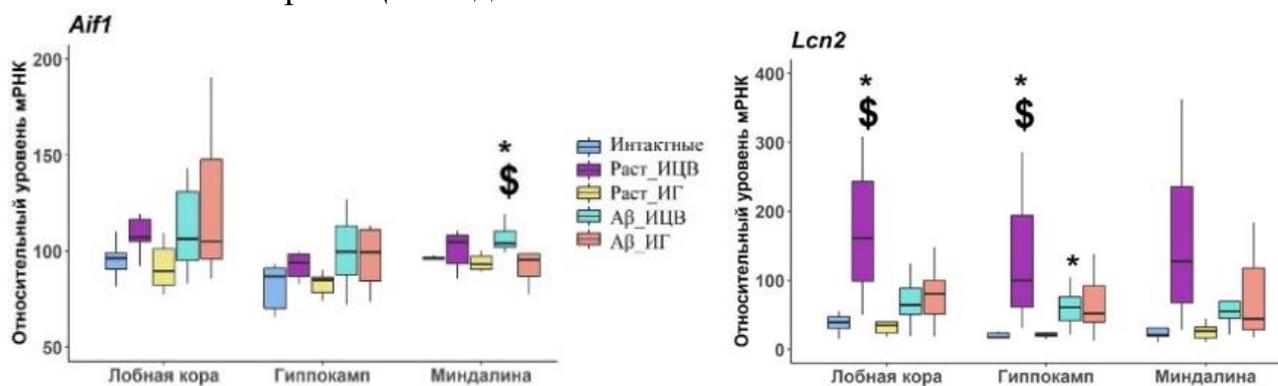


Рисунок 4. Влияние ИЦВ или ИГ введения Аβ₀₂₅₋₃₅ на уровни экспрессии мРНК генов *Aif1*, *Lcn2* в лобной коре, гиппокампе и миндалевидном теле мышей C57BL/6. * $p < 0,01$ по сравнению с интактной группой, \$ $p < 0,01$ по сравнению с группой «Раст_ИГ» с учетом поправок Бонферрони.

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил различий в экспрессии маркера плотности нейронов NEUN между группами ни во фронтальной коре, ни в СА1, ни в СА3 областях гиппокампа при ИЦВ и ИГ способах введения А β О25-35, но выявил увеличение экспрессии маркера аутофагии LC3-II во фронтальной коре после ИГ введения по сравнению с интактными ($F(4,11) = 5,31, p < 0,05$). Таким образом, введение А β О25-35 как в боковые желудочки, так и в гиппокамп мышам C57BL/6 нарушало долговременную ассоциативную память, увеличивало накопление амилоида, активировало микроглию во фронтальной коре и гиппокампе (СА1 и СА3 зоны). Выявлены и различия, связанные с областью введения А β О25-35 в мозг. При ИЦВ введении А β О25-35 происходит активация экспрессии гена маркера активации астроглии *Lcn2* и гена маркера активации микроглии *Aif1* в гиппокампе и миндалине.

2. Изучение эффектов совместной активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии в качестве терапевтического подхода у мышей с альцгеймероподобной патологией

В тесте пассивного избегания (Рис. 5) все способы терапии (рапамицин, трегалоза или их комбинация) улучшили дефицит обучения, о чем свидетельствует более длительное латентное время перехода по сравнению с группой с введением амилоида («А β »). Аддитивный терапевтический эффект совместного применения рапамицина и трегалозы в данном тесте отсутствовал.

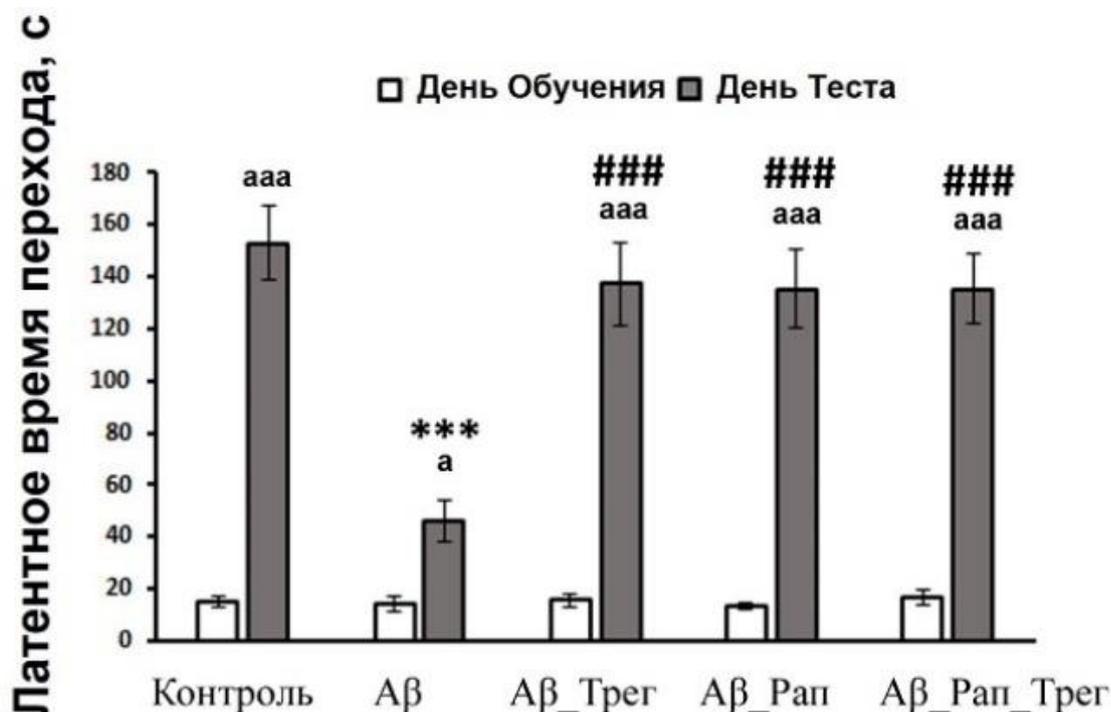


Рисунок 5. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации в тесте пассивного избегания у мышей на А β -индуцированной модели БА. а $p < 0,05$, aaa $p < 0,001$ по сравнению со значениями в день обучения; *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «Контроль»; ### $p < 0,001$ по сравнению с группой «А β ».

Активацию аутофагии у мышей на Аβ-индуцированной модели исследовали во фронтальной коре, СА1, СА3, зубчатой извилине, амигдале (Рис. 6). Отмечено увеличение флуоресценции LC3-II после использования трегалозы по сравнению с группой Аβ во фронтальной коре, зоне СА3 гиппокампа. Рапамицин в используемой дозе не изменял экспрессию LC3-II ни в одной из исследуемых структур. Совместное же применение рапамицина и трегалозы увеличило уровень экспрессии LC3-II до максимальных значений во всех исследуемых структурах у мышей на Аβ-индуцированной модели БА.

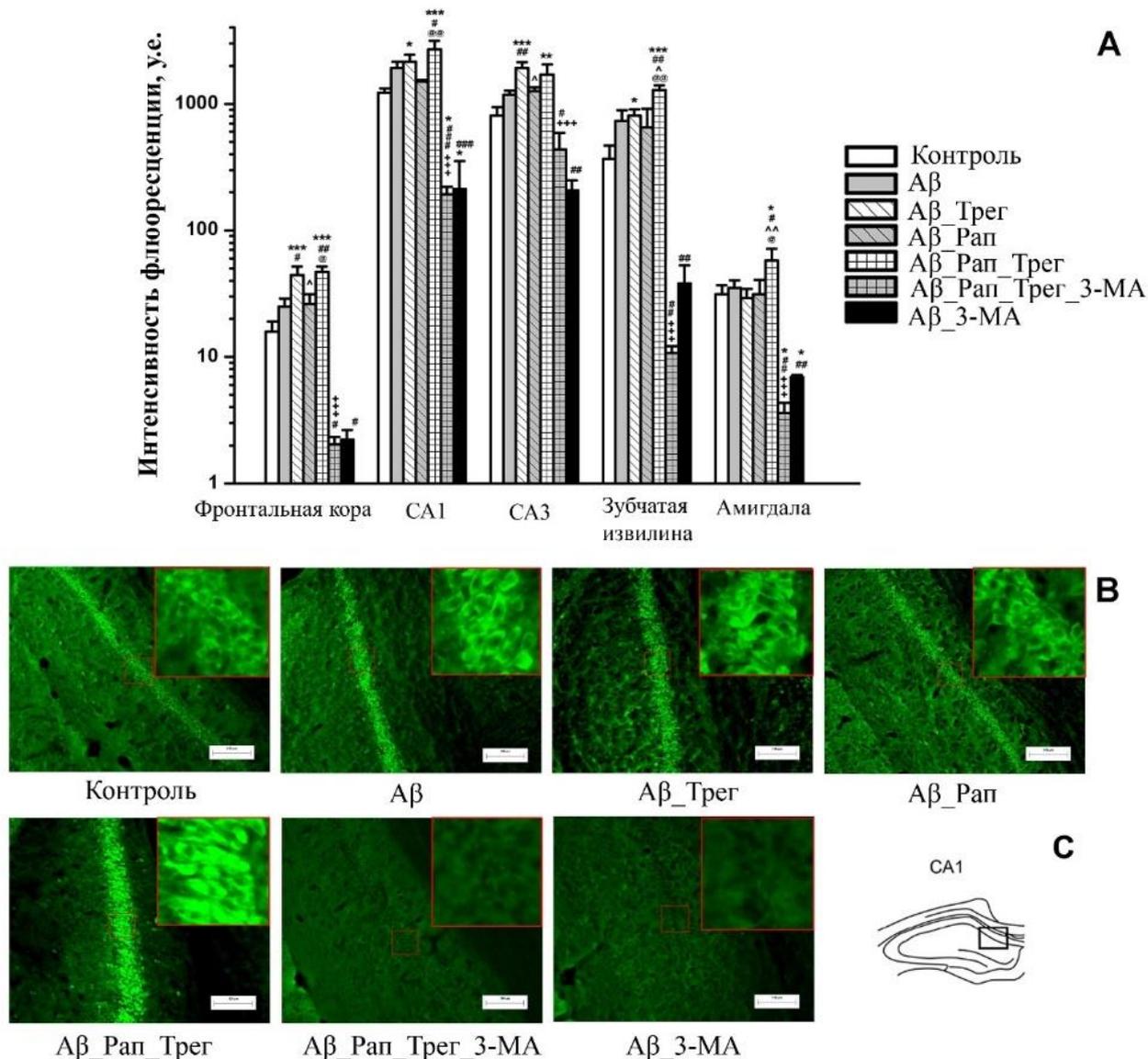


Рисунок 6. Влияние рапамицина, трегалозы, 3-метиладенина или их комбинации на активность аутофагии в структурах мозга мышей. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «Контроль»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с группой «Аβ»; ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$ по сравнению с группой «Аβ_Трег»; @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,01$ по сравнению с группой «Аβ_Рап»; +++ $p < 0,001$ по сравнению с группой «Аβ_Рап_Трег».

Важным вопросом в изучении терапевтического эффекта индукторов аутофагии была их способность влиять на накопление амилоида в мозге мы-

шей. Накопление $A\beta$ было достоверно снижено под действием трегалозы, рапамицина или их комбинированного применения (Рис. 7). Однако, эффект изолированного или совместного применения достоверно не отличался.

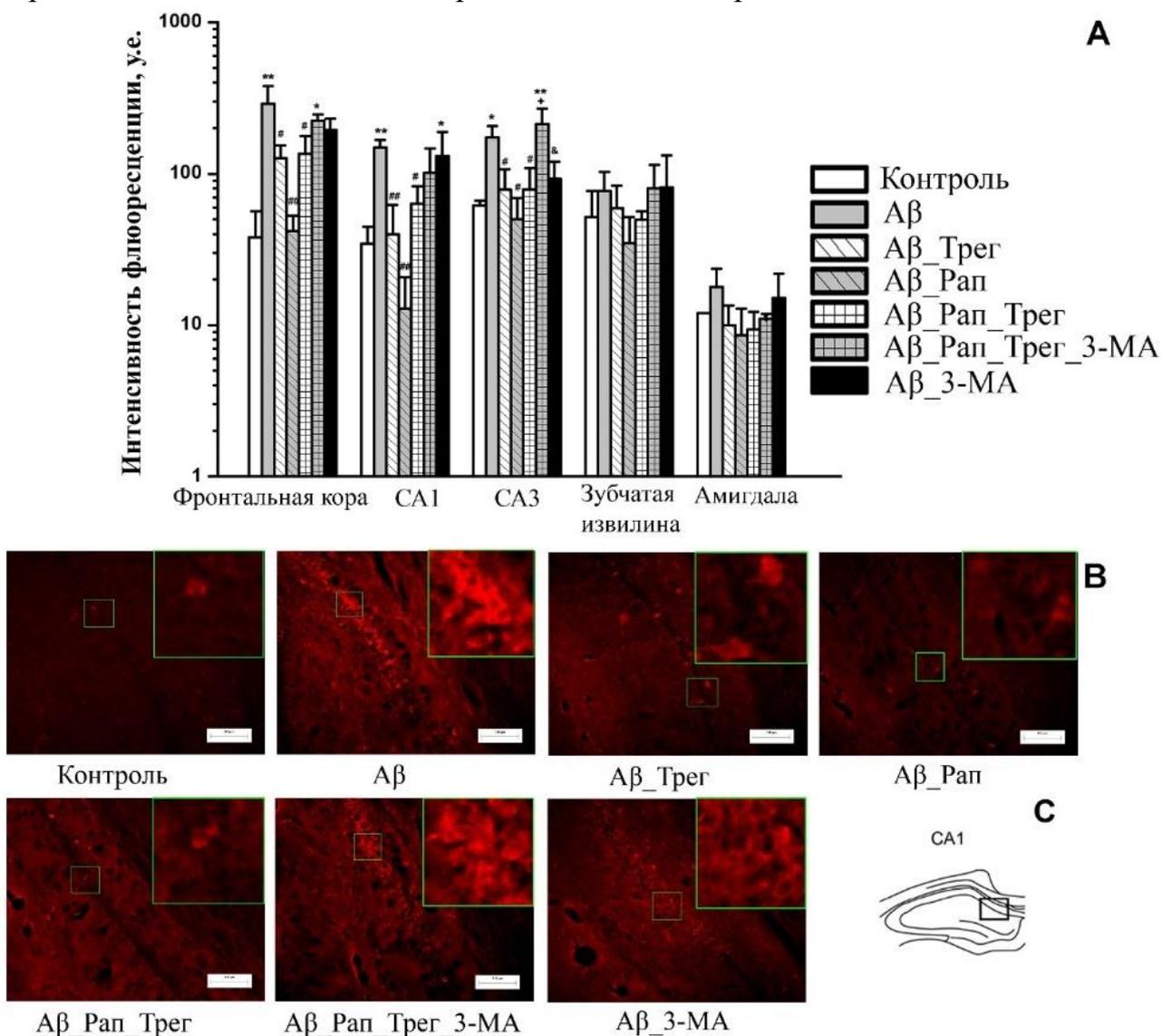


Рисунок 7. Влияние рапамицина, трегалозы, 3-метиладенина или их комбинации в отношении накопления $A\beta$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с группой «Контроль»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по сравнению с группой « $A\beta$ »; + $p < 0,05$ по сравнению с группой « $A\beta$ _Рап_Трег»; & $p < 0,05$ по сравнению с группой « $A\beta$ _Рап_Трег_3-МА».

Рапамицин и трегалоза по отдельности или в комбинации в равной степени ослабляли активацию микроглии в исследуемых структурах мозга у мышей, получавших $A\beta_{O25-35}$, что свидетельствует об их противовоспалительных свойствах (Рис. 8).

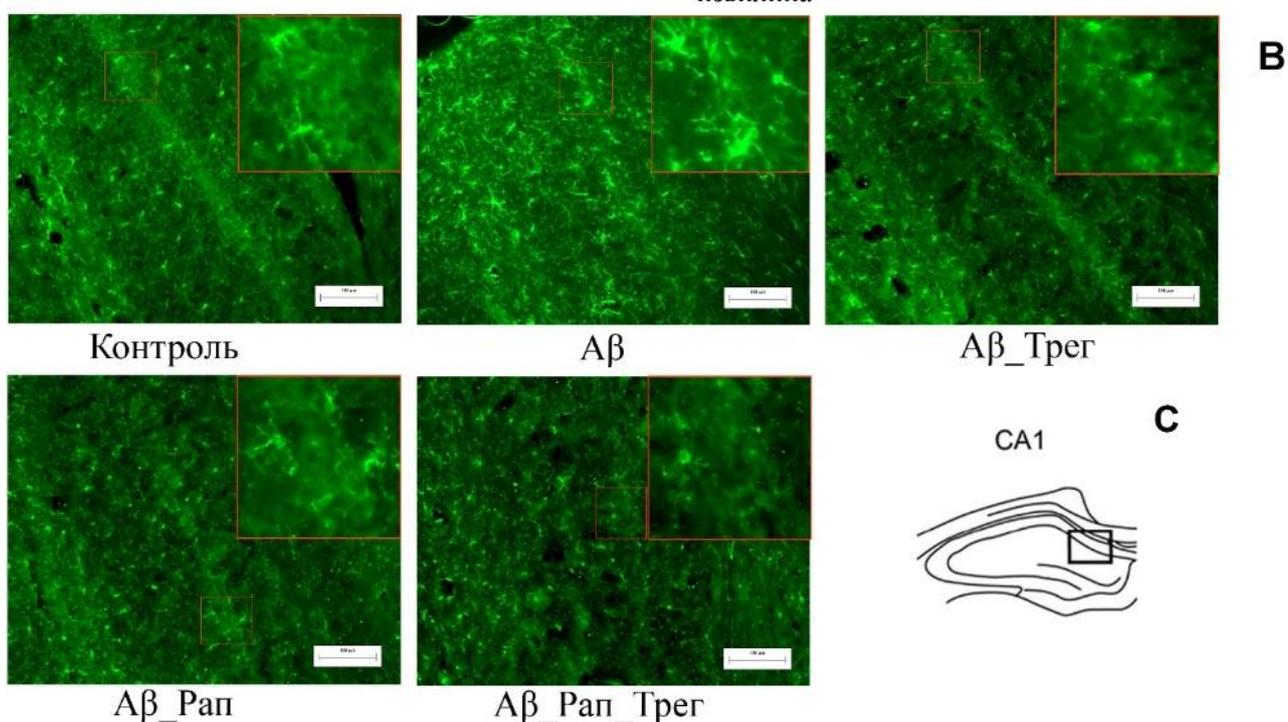
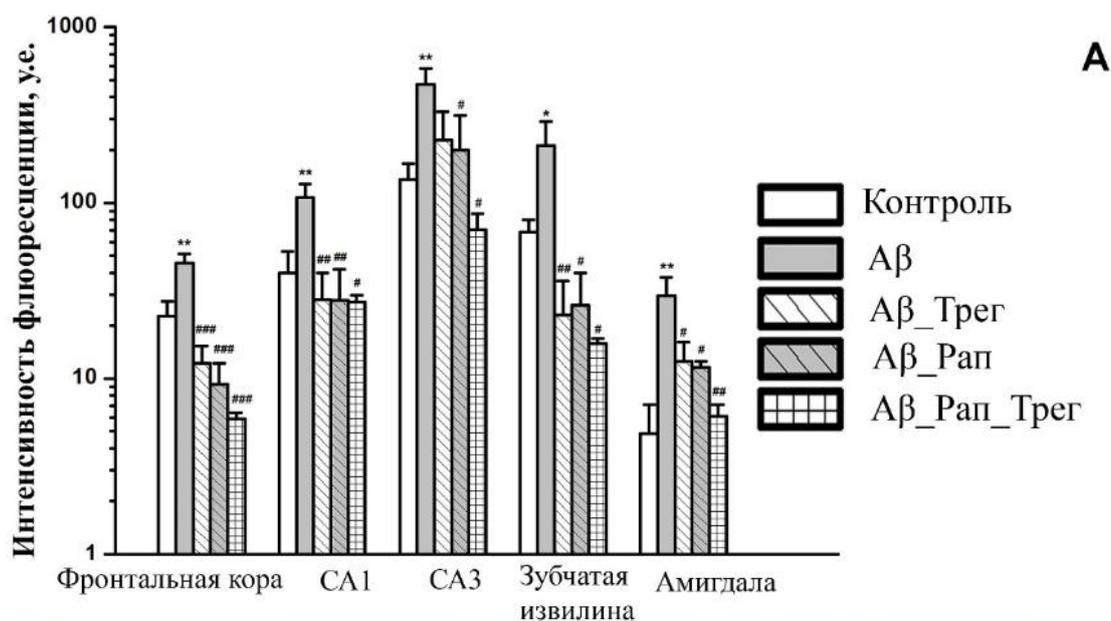


Рисунок 8. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации на экспрессию IBA1. * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по сравнению с группой «Aβ».

Таким образом, выявлен дифференциальный вклад как отдельной, так и совместной активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии в коррекцию поведенческих нарушений, накопление Aβ, активацию микроглии у мышей с альцгеймероподобной патологией. Раздельная активация оказалась эффективной в восстановлении когнитивных нарушений у мышей, снижении накопления Aβ, активации микроглии в структурах мозга, а совместная активация эффективно снижала тревожность мышей и усиливала экспрессию маркера аутофагии LC3-II в зубчатой извилине гиппокампа и миндалевидном комплексе.

3. Влияние цефалоспоринового антибиотика цефтриаксона на когнитивные дефициты, накопление $A\beta$, показатели нейровоспаления, плотность нейронов у мышей с центральным введением $A\beta$ O25-35 в боковые желудочки мозга

Цефтриаксон (100 мг/кг/день, 36 дней) восстанавливал нарушенную $A\beta$ долговременную ассоциативную память у мышей в тесте **пассивного избегания**. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора Цеф ($F(1,17) = 5,2, p < 0,05$) на латентное время перехода мышей в темную зону в день тестирования. В тесте **T-образный лабиринт** процент правильных выборов в группе с введением амилоида и цефтриаксона (« $A\beta$ _Цеф») был выше, чем в группе с введением амилоида и физ. раствора (« $A\beta$ _Физ»), свидетельствуя о способности Цеф улучшать кратковременную рабочую память мышей (Рис. 9F).

Дополнительно, мышей протестировали в системе Intellicage, предназначенной для автоматического мониторинга поведенческого профиля мышей в течение длительного периода времени, в условиях домашней клетки, без каких-либо стрессирующих манипуляций экспериментатора. Выявлен протективный эффект Цеф на пространственную память мышей в группе с введением амилоида и цефтриаксона (« $A\beta$ _Цеф») в первый день теста **условной реакции предпочтения места** (Рис. 9A). Под влиянием Цеф процент правильных посещений у них не снижался, тогда как в группе с введением амилоида и физ. раствора (« $A\beta$ _Физ») был существенно ниже по сравнению с контрольными мышами, получающими растворитель и физ. раствор («Раст_Физ»). Как видно из Рис. 9B, наибольшая разница в процентном отношении правильных посещений между мышами из группы « $A\beta$ _Физ» и мышами из группы «Раст_Физ» была в течение периода 3–6 часов первого дня. На 2–5-й день показано увеличение процента правильных посещений, по сравнению с первым днем (периодом обучения) мышей всех экспериментальных групп, что свидетельствовало об их равной способности к обучению.

Отсутствие влияния Цеф показано в отношении когнитивной гибкости в тесте **переучивания условной реакции предпочтения места** (Рис. 9C), долговременной ассоциативной памяти в тесте **условного избегания** (Рис. 9D), исполнительного контроля, рабочей памяти, когнитивной гибкости в тесте **на патрулирование** (Рис. 9E), осуществленных в системе Intellicage.

Выявленные неоднозначные эффекты Цеф на долговременную ассоциативную память мышей при использовании классического теста условного избегания и теста, проведенного в системе Intellicage, можно объяснить различиями в силе и характере используемых безусловных стимулов. Так, в камере Gemini безусловным стимулом, предъявляемый животным, является удар электрическим током, который сопровождается выработкой убедительной ассоциативной связи, даже после однократного сеанса. В системе Intellicage аверсивным стимулом был поток воздуха, который хоть и вызывал негативные эмоции, но не обладал достаточной модальностью для выработки устойчивой связи.

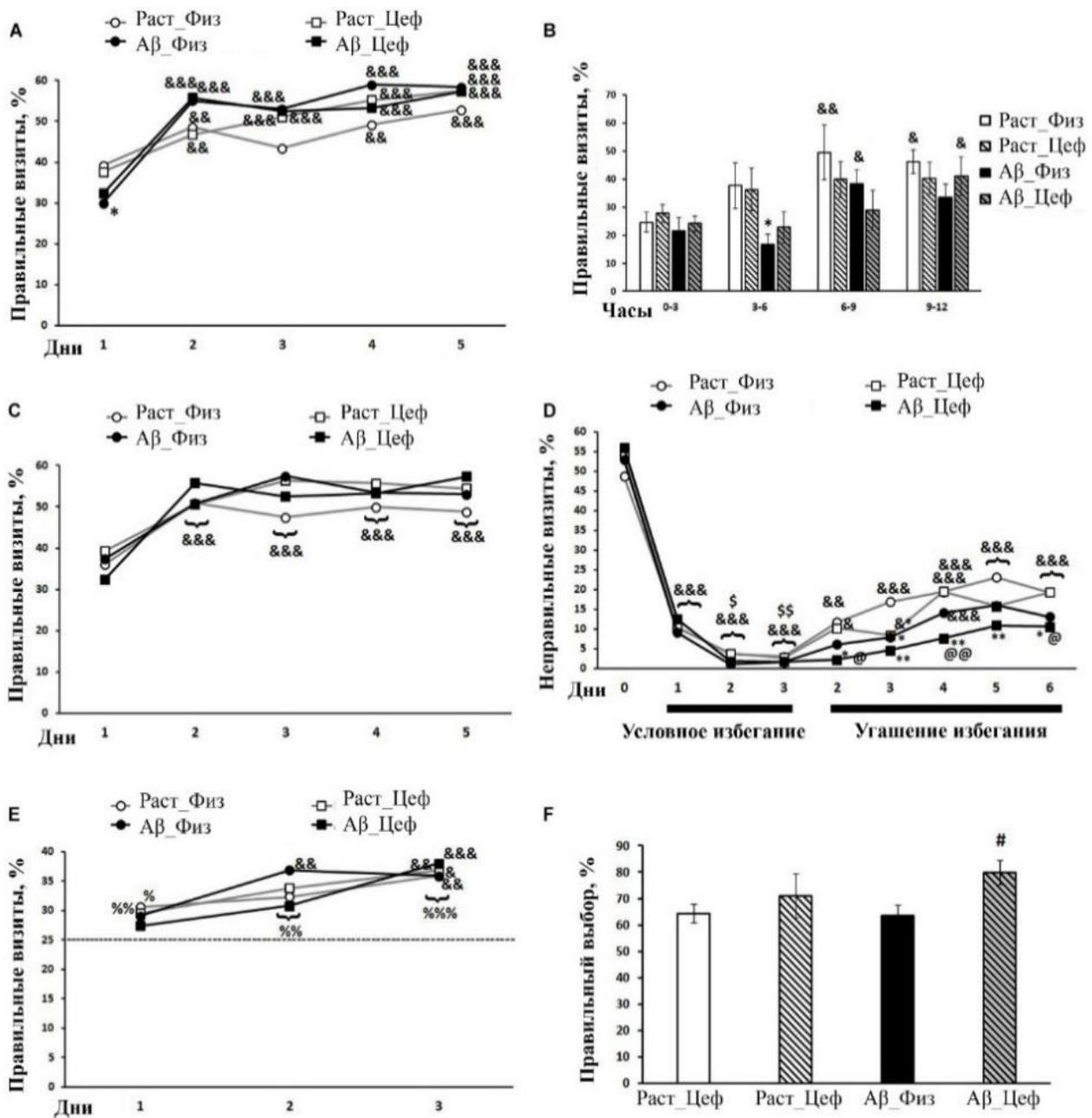


Рисунок 9. Влияние введения Цеф и Аβ_{25–35} на когнитивный профиль в системе IntelliCage (А-Е) и в Т-образном лабиринте (F) на мышах. & $p < 0,05$, && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ по сравнению со значениями той же группы в первую временную точку фазы; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ по сравнению со значениями, полученными в той же группе в первый день теста условного избегания; % $p < 0,05$, %% $p < 0,01$, %%% $p < 0,001$ по сравнению с уровнем вероятности (25%); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с соответствующими значениями группы «Раст_Физ»; # $p < 0,05$ по сравнению с соответствующими значениями группы «Аβ_Физ»; @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,01$ по сравнению с соответствующими значениями группы «Раст_Цеф».

Улучшение когнитивного дефицита у мышей после терапии Цеф сопровождалось отсутствием изменений в плотности нейронов во фронтальной коре и гиппокампе, снижением накопления Аβ во фронтальной коре ($F(1,8) = 30,1$, p

< 0,001) и гиппокампе ($F(1,8) = 9,5, p < 0,05$), активацией микроглии во фронтальной коре ($F(1,10) = 17,53, p < 0,01$). Положительная корреляция между накоплением Аβ и экспрессией CD54 была обнаружена в СА3 зоне гиппокампа ($r_{11} = 0,61, p < 0,05$). Цефтриаксон снижал экспрессию воспалительного маркера CD54 до уровня контрольных значений во фронтальной коре и гиппокампе (Рис. 10). Противовоспалительный эффект Цеф в основном связан с подавлением эксайтотоксичности глутамата, развивающейся при БА, за счет увеличения экспрессии GLT-1 – основного глутаматного транспортера в синапсах (Zumkehr et al, 2015). Помимо этого, воздействие Цеф на CD54 через NRF2 может влиять на белки семейства сиртуинов, известные своими противовоспалительными свойствами и способностью замедлять процессы старения (Xia et al, 2020).

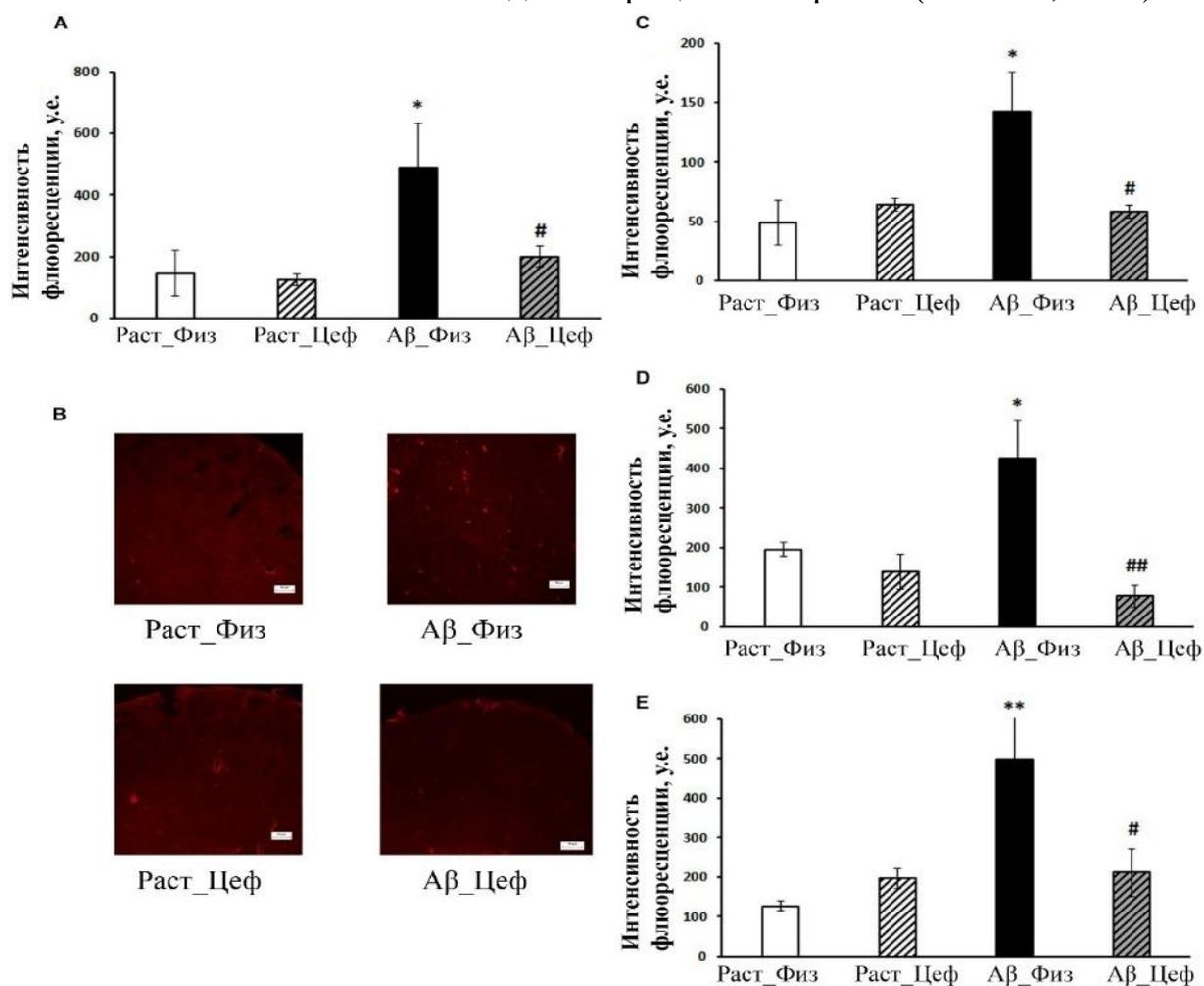


Рисунок 10. Влияние введения Цеф и Аβ_{25–35} на экспрессию воспалительного маркера CD54 во фронтальной коре (А, В) или гиппокампе (С в области СА1; D в области СА3; Е в зубчатой извилине) у мышей. (А, С – Е). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с группой «Раст_Физ»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по сравнению с группой «Аβ_Физ».

Таким образом, выявлен терапевтический эффект цефтриаксона в восстановлении когнитивных нарушений, снижении повышенной экспрессии Аβ во фронтальной коре и гиппокампе, снижении экспрессии маркеров воспаления IBA1 во фронтальной коре, CD54 во фронтальной коре, СА1, СА3 областях и в зубчатой извилине гиппокампа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На нейротоксической модели БА у мышей как ИЦВ (10 мкг), так и ИГ (5 мкг) билатеральное введение олигомеров Аβ вызывало нарушение когнитивных показателей, сопровождающееся сопоставимым накоплением Аβ и развитием нейровоспаления. Независимо от области введения, показано накопление амилоида во фронтальной коре, СА1, СА3, зубчатой извилине гиппокампа, высокозначимых для реализации когнитивных функций.

Повышение уровней мРНК гена *Lcn2* в коре и в гиппокампе более чем в 3 раза отчетливо проявилось в группе мышей с ИЦВ введением, что свидетельствует о более выраженной провоспалительной реакции по сравнению с ИГ введением. Выявленные особенности в экспрессии генов, обусловленных ИЦВ или ИГ введением АβO25-35, необходимо учитывать при экспериментальном исследовании различных аспектов БА.

Впервые на модели БА *in vivo* оценены терапевтические эффекты комбинированного воздействия индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы. Показан кумулятивный эффект индукторов mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии на анксиогенный эффект введения АβO25-35. Активация mTOR-зависимой аутофагии рапамицином и mTOR-независимой аутофагии трегалозой приводит к снижению накопления Аβ, противовоспалительному эффекту, восстановлению когнитивных нарушений мышей на нейротоксической модели БА. Полученные результаты могут быть использованы для разработки нового терапевтического подхода в клинической практике.

Результаты данного исследования подтверждают значимость молекул, имеющих в структуре бета-лактамовое кольцо, в качестве перспективного лечения когнитивных дефицитов на ранних стадиях БА. Показана патогенетически обоснованная коррекция цефтриаксоном когнитивных нарушений, которая характеризуется снижением накопления Аβ, нейровоспалительной реакции в мозге мышей и согласуется с предыдущими сообщениями о благотворном влиянии цефтриаксона на когнитивные нарушения у крыс на модели БА.

ВЫВОДЫ

1. Введение АβO25-35 как в боковые желудочки, так и в гиппокамп мышам C57BL/6 нарушало долговременную ассоциативную память, увеличивало накопление амилоида, активировало микроглию во фронтальной коре и гиппокампе (СА1 и СА3 зоны). Показан провоспалительный эффект внутрижелудочкового, но не внутригиппокампального введения, отмеченного по повышению уровней мРНК гена *Lcn2* в гиппокампе и гена *Aif1* в амигдале.

2. Активация mTOR-зависимой и mTOR-независимой аутофагии восстанавливала когнитивные нарушения у мышей с введением АβO25-35 в боковые желудочки, снижала накопление Аβ, активацию микроглии во фронтальной коре и гиппокампе (СА1, СА3 области, зубчатая извилина) мышей. Показан кумулятивный эффект совместной активации аутофагии рапамицином и трегало-

зой на экспрессию маркера аутофагии LC3-II в зубчатой извилине гиппокампа и миндалевидном комплексе мышей.

3. Цефтриаксон восстанавливал нарушенную внутрижелудочковым введением A β О25-35 долговременную ассоциативную память (тест пассивного избегания), кратковременную рабочую память (Т-образный лабиринт), пространственную память (система Intellicage) мышей, восстанавливал до контрольных значений повышенную экспрессию A β во фронтальной коре, СА1 и СА3 областях гиппокампа, снижал экспрессию маркеров воспаления IBA1 во фронтальной коре, CD54 во фронтальной коре, СА1, СА3 областях и в зубчатой извилине гиппокампа.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Pupyshev, A. B., Belichenko, V. M., Tenditnik, M. V., **Bashirzade, A. A.**, Dubrovina, N. I., Ovsyukova, M. V., ... & Tikhonova, M. A. / Combined induction of mTOR-dependent and mTOR-independent pathways of autophagy activation as an experimental therapy for Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2022. – Т. 217. – С. 173406.
2. Tikhonova, M. A., Amstislavskaya, T. G., Ho, Y. J., Akopyan, A. A., Tenditnik, M. V., Ovsyukova, M. V., **Bashirzade, A. A.**, ... & Aftanas, L. I. / Neuroprotective effects of ceftriaxone involve the reduction of A β burden and neuroinflammatory response in a mouse model of Alzheimer's disease // *Frontiers in Neuroscience*. – 2021. – С. 1219.
3. **Bashirzade, A. A.**, Zabegalov, K. N., Volgin, A. D., Belova, A. S., Demin, K. A., de Abreu, M. S., ... & Kalueff, A. V. / Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2022. – С. 104679.
4. Pupyshev, A. B., Tenditnik, M. V., Belichenko, V. M., Ovsyukova, M. V., Dubrovina, N. I., **Bashirzade, A. A.**, ... & Tikhonova, M. A. / Therapeutic efficacy of autophagy inducers rapamycin and trehalose in an animal model of Alzheimer's disease. // *ESGLD Workshop and Graduate course*. – 2019. – С. 55-55.
5. **Баширзаде, А. А.** / Экспериментальное исследование эффектов индукторов аутофагии (рапамицина и трегалозы) в терапии когнитивных нарушений у мышей на фармакологической модели болезни Альцгеймера. // *Международная научная студенческая конференция (МНСК-2020)*. – 2020. – С. 122-122.
6. Амстиславская, Т.Г., Тихонова, М.А., Акопян, А.А., **Баширзаде, А.А.**, Ying-Jui Ho. / Влияние цефтриаксона на нейрональный и поведенческий дефицит в анимальных моделях нейродегенеративных заболеваний // *Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддиктивных расстройств*. – 2020. – С. 5-6.
7. Tikhonova M.A., Belichenko V.M., **Bashirzade A.A.**, Tenditnik M.V., Amstislavskaya T.G. / Modulation of the expression of genes related to the neuroinflammation, autophagy, and neurodegeneration in the brain by the central administration of amyloid-beta in mice // *Высокопроизводительное секвенирование в геномике (HSG-2022)*. – 2022. – С. 89-89.

8. **Bashirzade A.**, Pupyshev A., Belichenko V., Tenditnik M., Dubrovina N., Ovsyukova M., Akopyan A., Amstislavskaya T., Tikhonova M. / Combined treatment with autophagy inducers rapamycin and trehalose as an experimental therapy for Alzheimer's disease-like pathology in mice // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022). – 2022. – С. 731-731.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А β – амилоид-бета

А β О25-35 – олигомеры амилоида бета, полученные из фрагмента 25-35.

БА – болезнь Альцгеймера

ИЦВ – интрацеребровентрикулярное введение

ИГ – интрагиппокампальное введение

Цеф – цефтриаксон

Aif1 - allograft inflammatory factor 1, ген аллотрансплантантного воспалительного белка 1

IBA1 - ionized calcium-binding adapter molecule 1, адаптерная молекула 1, связывающая ионизированный кальций

LC3 – microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, белок аутофагии
MAP1LC3B

Lcn2 - lipocalin 2, ген белка липокалин 2

mTOR - mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих

Соискатель Баширзаде А.А.

