

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-1-6-15

# ПРОВосПалительный фенотип Периваскулярной астроглии и CD133+ клеток- предшественников эндотелиоцитов при моделировании болезни Альцгеймера у мышей

Черных А.И.<sup>1,3</sup>, Комлева Ю.К.<sup>1,2</sup>, Горина Я.В.<sup>1,2</sup>, Лопатина О.Л.<sup>1,2</sup>, Пашенко С.И.<sup>2</sup>, Салмина А.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия

<sup>3</sup>КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница №20 им. И.С. Берзона», Красноярск, Россия

## ORIGINAL ARTICLE

### PRO-INFLAMMATORY PHENOTYPE OF PERIVASCULAR ASTROCYTES AND CD133+ ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN MURINE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

ANATOLIY I. CHERNYKH<sup>1,3</sup>, YULIYA K. KOMLEVA<sup>1,2</sup>, YANA V. GORINA<sup>1,2</sup>, OLGA L. LOPATINA<sup>1,2</sup>SVETLANA I. PASCHENKO<sup>2</sup>, ALLA B. SALMINA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (1 Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022), Russian Federation

<sup>2</sup>Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizan Zheleznyak Street, Krasnoyarsk, 660022), Russian Federation

<sup>3</sup>Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Hospital № 20 named after I.S. Berzon (12, Instrumentalnaya Street, Krasnoyarsk, 660123), Russian Federation

## Резюме

**Цель.** Изучить экспрессию *NLRP3* в периваскулярной астроглии и *CD133+* эндотелиальных клетках-предшественниках при амилоид-индуцированной нейродегенерации.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на мышах мужского пола линии *CD1* (4 месяцев, весом 25-30 г). Мышам экспериментальной группы введен  $A\beta 1-42$  в гиппокамп головного мозга. Через 10 дней после инъекции провели иммуногистохимическую оценку экспрессии *NLRP3* инфламмасом в *S100beta* и *CD133+* клетках методом визуализации конфокальной микроскопии. Определили коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент перекрытия по Manders (overlap coefficient).

**Результаты.** Определено увеличение экспрессии *S100beta*-позитивных клеток при введении бета-амилоида в гиппокамп животных. При оценивании колокализации *S100beta/NLRP3* выявлена выраженная положительная кор-

реляция двух маркеров *S100beta* и *NLRP3* в клетках зубчатой извилины обеих групп животных. При иммуногистохимическом исследовании *CD133+* клеток-предшественниц не зафиксировано статистически значимых отличий при моделировании нейродегенерации и при проведении ложной операции, однако наблюдалась тенденция к снижению экспрессии данного маркера при введении олигомеров бета-амилоида. Тем не менее, при моделировании амилоид-индуцированной нейродегенерации отмечается статистически значимое увеличение колокализации *CD133/NLRP3*.

**Заключение.** При моделировании болезни Альцгеймера отмечается эффект активации глии с экспрессией *S100beta*. Увеличение экспрессии *S100beta* может свидетельствовать о том, что при экспериментальной болезни Альцгеймера *S100beta*-иммунопозитивные (протоплазматические, ассоциированные с периваскулярной единицей) астроциты в пределах

нейрогенных ниш реагируют на нейротоксическое действие олигомеров бета-амилоида. По данным иммуногистохимического анализа было показано, что развитие воспаления в ткани головного мозга при нейротоксическом действии бета-амилоида связано с формированием *NLRP3*-инфламмасом в нейрогенной нише головного мозга, что в конечном итоге может приводить к нарушению процессов синаптогенеза, нейрогенеза и ангиогенеза, ассоциированных с репарацией или реализацией когнитивных функций. Экспрессия инфламмасом

*NLRP3* в *CD133*+ клетках-предшественниках эндотелиальных клеток увеличивается при моделировании болезни Альцгеймера. Такой провоспалительный фенотип клеток, по всей видимости, необходим для формирования сложного самоактивирующегося порочного круга, способного приводить к дальнейшей дисфункции нейроваскулярной единицы.

**Ключевые слова:** периваскулярная астроглия, инфламмасомы *NLRP3*, клетки-предшественники эндотелиоцитов, моделирование болезни Альцгеймера у мышей.

## Abstract

**Aim.** To study the expression of *NLRP3* in perivascular astrocytes and *CD133*+ endothelial progenitor cells in mice with amyloid-induced neurodegeneration.

**Materials and Methods.** Ten days following intrahippocampal injection of *Aβ*<sub>1-42</sub>, male *CD1* mice (4 months, weight 25-30 g) were sacrificed with the further immunohistochemical examination of the *NLRP3* expression in *S100 beta* + and *CD133*+ cells using confocal microscopy.

**Results.** We detected an increased number of *S100beta* + cells upon the administration of  $\beta$ -amyloid to the hippocampus. Moreover, a strong colocal-

ization of *S100beta* and *NLRP3* in the dentate gyrus of both groups was revealed indicative of neuroinflammation. *CD133* immunostaining did not identify any differences in *CD133*+ cells between mice with Alzheimer's disease and sham-treated mice, yet there was a notable reduction in *CD133*+ cell count after intrahippocampal injection of  $\beta$ -amyloid.

**Conclusion.** Neuroinflammation induced by  $\beta$ -amyloid is associated with the formation of *NLRP3* inflammasomes and decreased neovascularization capacity.

**Keywords:** perivascular astrocytes, *NLRP3* inflammasomes, endothelial progenitor cells, Alzheimer's disease.

◀ English

## Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной причиной деменции у пожилых людей, характеризуется изменением когнитивных функций, а также появлением в мозге сенильных бляшек, нейрофибриллярных клубков и потерей нейронов [1].

Существенные генетические, биохимические и *in vivo* данные свидетельствуют о том, что прогрессирующее накопление амилоида- $\beta$  ( $A\beta$ ) играет центральную роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Исторически сложилось так, что именно формирование амилоидных бляшек в паренхиме мозга было центральным пунктом, тем не менее, в настоящее время начинает проявляться все больше данных о роли церебральной амилоидной ангиопатии, которая сопровождается отложениями более чем в 80% случаев БА [2].

Церебральная амилоидная ангиопатия ассоциируется с микрососудистыми изменениями, ишемическими поражениями, микро- и макро-кровоизлияниями и деменцией, посте-

пенно влияя на мозговой кровоток, изменяя проницаемость гематоэнцефалического барьера, препятствуя механизмам очищения мозга и вызывая каскад провоспалительных и метаболических событий, которые нарушают целостность нейроваскулярной единицы. Новые данные свидетельствуют о вкладе  $A\beta$  в индукцию дисфункции эндотелиальных клеток головного мозга. Недавно обнаруженное взаимодействие олигомерных форм  $A\beta$  с рецепторами клеточной гибели, которое опосредует взаимодействие митохондриальных путей и последовательную активацию множественных каспаз, вызывая каскад механизмов клеточной гибели, открывает возможность изучения новых подходов к сохранению целостности нейроваскулярной единицы [3].

В большинстве исследований, связанных с изучением механизмов, стимулирующих воспаление при нейродегенерации, основное внимание уделяется роли микроглиальных клеток, в то время как немного известно о вкладе клеток стенок сосудов, несмотря на мощный вос-

палительный потенциал как эндотелиальных клеток, так и их предшественников. Вместе с тем, эти клетки вовлечены в формирование локального воспаления, способны секретировать широкий спектр медиаторов, начиная от провоспалительных и регуляторных интерлейкинов (например, *IL-1*, 6, 8, 10), колоний-, гранулоцитарных и макрофагально-стимулирующих факторов и хемокинов, важных медиаторов регуляции цитокинов, таких как *TNF- $\alpha$*  и *IFN- $\gamma$*  [4].

Кроме того, несмотря на многочисленные успехи в понимании патогенеза болезни Альцгеймера, мало известно о роли глиальных клеток при хронической нейродегенерации [5]. Также известно, что микроглия участвует в поддержании гомеостаза взрослого и развивающегося мозга, обеспечивая локальный иммунный ответ. Вместе с тем, астроциты – это не менее активные участники процессов, связанных с развитием локального воспаления и иммунного ответа в головном мозге, что становится все более очевидным в последние годы [6].

Микроглия и астроциты все чаще распознаются как клетки, имеющие ключевые иммунологические функции в головном мозге, и их роль в развитии БА была недавно исследована [7]. Более того, микроглия и астроциты экспрессируют *toll*-подобные рецепторы (*TLR*) и опосредуют ответы на врожденные иммунные триггеры, выделяя провоспалительные молекулы [8].

Одной из таких молекул, способной контролировать активность каспазы-1 и участвовать в созревании *IL1beta*, является цитозольный мультипротеиновый комплекс, называемый «инфламасома». Инфламасома представляет собой олигомерный белковый комплекс, организованный как трехсторонняя структура: (1) сенсор цитозольной опасности семейства *NLR* (*NOD*-подобных рецепторов), такой как *NALP3* (*NACHT*, *LRR* и *PYD*-содержащий белок 3), также известный как *NLRP3* (*NOD*-подобное рецепторное семейство, пириновый домен, содержащий 3) и *NALP1* или *IPAF* (фактор активации криопротеазы), (2) протеолитическая эффекторная каспаза-1 и (3) *ASC* (ассоциированный с апоптозом спекподобный белок, содержащий *CARD* домен), адаптерный белок, необходимый для сборки *NLR* и стабилизации комплексов каспазы-1/*NLR* [9].

Недавно было продемонстрировано, что инфламасомы, экспрессирующие *NLRP3*, мо-

гут быть активированы бета-амилоидом *in vitro*, что приводит к воспалению и повреждению тканей [10].

К числу наименее изученных молекулярных событий при нейровоспалении следует отнести процесс формирования инфламасом при действии олигомеров  $A\beta$  в клетках глиальной природы и эндотелиальных клетках предшественниках [11],

## Цель исследования

Изучить экспрессию *NLRP3* в периваскулярной астроглии и *CD133+* эндотелиальных клетках-предшественниках при амилоид-индуцированной нейродегенерации.

## Материалы и методы

### Животные

Эксперименты проводили с использованием самцов мышей линии *CD1* (4 месяцев, весом 25-30 г). Животных содержали по 4-5 особей в клетке при температуре на уровне 21-22°C со свободным доступом к воде и корму и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь. Все манипуляции выполнялись во время светлой фазы дня. В ходе эксперимента были приняты все усилия для сведения к минимуму страданий животных и сокращения их числа. Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского Парламента и Совета Европейского союза (2010/63/ЕС) и с разрешения биоэтической комиссии при КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

### Дизайн эксперимента

Животных случайным образом поделили на две группы ( $n = 8$  в группе: 1) ложно-оперированные животные с введением фосфатно-буферного солевого раствора (PBS); 2) экспериментальная группа с введением  $A\beta 1-42$ . Через 10 дней после интрагиппокампальной инъекции проводили транскардиальную перфузию после эвтаназии с забором головного мозга [12].

*Хирургическое моделирование болезни Альцгеймера*

$A\beta 1-42$  (Sigma-Aldrich) был растворен в стерильном 0,1 М PBS (pH 7,4) и получен раствор в концентрации 50  $\mu$ M. Аликвоты хранили при -20°C.  $A\beta 1-42$  агрегировали путем инкубации при 37°C в течение 7 дней перед введением [12,13]. Полученные олигомеры  $A\beta 1-42$

вводили интрагиппокампажно в СА1 зону с двух сторон с помощью микрошприца (Hamilton), как описано ранее [12]. А именно, мышь анестезировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата (400 мг/кг) и убеждались в отсутствии реакции на боль, а также роговичного рефлекса. Затем мышь помещали в стереотаксический аппарат (Neurostar, Germany) и делали оперативный доступ. После обнаружения костных ориентиров рассчитывались координаты введения для каждой мыши в соответствии с индивидуальным коэффициентом согласно стереотаксическому атласу мозга мыши [14].  $A\beta 1-42$  вводили билатерально в СА1 зону гиппокампа. Объем инъекции 1 мкл  $A\beta 1-42$  для экспериментальной группы или 1 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) для ложно-оперированных животных осуществляли постепенно (1 мкл/мин). Подтверждение наличия бета-олигомеров осуществили окраской Тιοфлавином S. После инъекции олигомеров амилоида в ткани головного мозга наблюдались флуоресцирующие амилоидные включения зеленого цвета.

Двойное иммуногистохимическое окрашивание

Мозг фиксировали в 4% нейтральном забуференном формалине в течение ночи, после чего погружали в 20% раствор сахарозы. Изготавливали срезы 50 мкм с помощью вибратома (Thermo Scientific). Свободно плавающие срезы мозга блокировали в PBS, содержащем 10% нормальной козьей сыворотки (Sigma), 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma), 0,2% Triton X-100 (Sigma) и 0,1% азида натрия (Sigma) в течение 1 часа при комнатной температуре. Для оценки экспрессии *NLRP3* на *S100beta*-позитивных клетках срезы инкубировали в течение ночи в растворе первичных антител 1:1000 с антителами против *S100beta* (Abcam, ab41548) и анти *NLRP3* антителами (Abcam, ab4207); для определения колокализации *CD133* и *NLRP3* использовали раствор первичных антител 1:1000, содержащий анти-*CD133* (Abcam, ab16518) и анти *NLRP3* антитела (Abcam, ab4207).

После инкубации с первичными антителами срезы промывали в PBS и затем инкубировали с вторичными антителами Alexa-конъюгированными (1:1000) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки срезы укладывали на предметные стекла и добавляли монтирующую жидкость (FluoroMount, Invitrogen). Изображения были сделаны с объективом 60 ×

на конфокальном флуоресцентном микроскопе (Olympus FluoView) и обрабатывались с использованием программного обеспечения Olympus FluoView software (Ver.4.0a).

Подсчет колокализации экспрессии маркеров

В срезах головного мозга определяли процент колокализации с *NLRP3* в клетках астроглиальной природы, экспрессирующих *S100beta*, а также экспрессию *NLRP3* в *CD133*-позитивных клетках в субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа. Оценивали семь полей зрения.

**Были определены следующие коэффициенты:** коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент перекрытия по Manders (overlap coefficient). Коэффициент корреляции Пирсона (Pearson's correlation coefficient, Коэффициент Пирсона) является одной из стандартных мер при определении колокализации изображений. Он отражает средние интенсивности каналов каждого маркера. Его значения варьируются от -1,0 до 1,0, где 0 не указывает на значительную корреляцию, а -1,0 свидетельствует о полной отрицательной корреляции.

Коэффициент перекрытия по Manders указывает на перекрытие сигналов и, таким образом, отражает истинную степень колокализации [15].

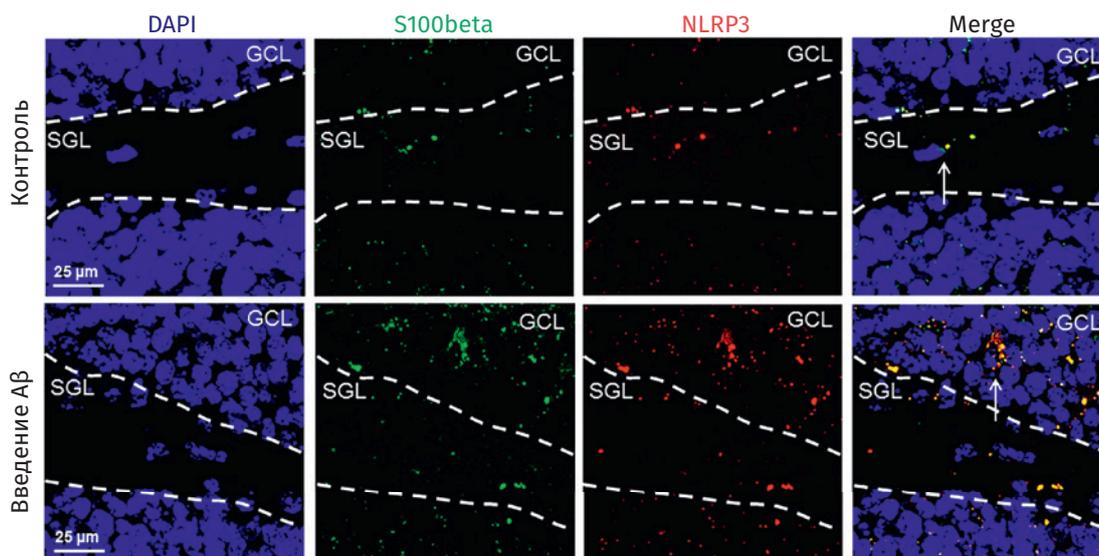
#### Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики с использованием программы GraphPad Prism 6,0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). В пределах каждой выборки определяли среднее арифметическое и ошибку среднего. Сравнение средних осуществляли с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни при уровне значимости  $p < 0,05$ . Все результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – ошибка среднего,  $p$  – уровень значимости.

## Результаты

В ходе анализа двойного иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга выявлено статистически значимое увеличение экспрессии *S100beta*-экспрессирующих клеток (**рисунок 1**) при введении бета-амилоида в гиппокамп животных. Так, количество клеток в опытной группе с введением бета-амилоида увеличилось до  $6,10 \pm 0,29$  в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа, тог-

**Рисунок 1.** Экспрессия *NLRP3* на *S100beta*+ протоплазматических астроцитах в зубчатой извилине гиппокампа головного мозга в экспериментальных группах. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия *NLRP3* +клеток (красный), *S100beta* +клеток (зеленый), DAPI-ядра (голубой), стрелки в Merge показывают колокализацию *NLRP3* с *S100beta* в зубчатой извилине гиппокампа в экспериментальных группах. Сокращения: GCL – гранулярный слой, SGL – субгранулярный слой



**Figure 1.** Expression of *NLRP3* on *S100beta*+ protoplasmic astrocytes in the dentate gyrus. *NLRP3*+ cells (red) and *S100beta*+ cells (green) in combination with DAPI nuclear staining (blue), Arrows show the colocalization of *NLRP3* with *S100beta* in the dentate gyrus. GCL is for granular layer, SGL is for subgranular layer

да как у ложно-оперированных животных экспрессия маркера *S100beta* составила  $2,45 \pm 0,38$  ( $p < 0,0001$ ). Далее в клетках, экспрессирующих *S100beta*, мы оценили колокализацию с маркером инфламмасом *NLRP3*, определив коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент перекрытия двух каналов по Manders (Overlap coefficient). Так, в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа мышей после введения PBS коэффициент перекрытия  $0,76 \pm 0,06$ , что статистически достоверно не отличалось от показателей у мышей после проведения моделирования амилоид-индуцированной нейродегенерации  $0,81 \pm 0,02$  ( $p = 0,68$ ). Коэффициент Пирсона составил  $0,77 \pm 0,03$  при инъекции бета-амилоида, а при проведении ложной операции с растворителем для бета-амилоида –  $0,7 \pm 0,08$  ( $p = 0,44$ ). Оба показателя указывают на выраженную положительную корреляцию двух маркеров *S100beta* и *NLRP3* в клетках зубчатой извилины обеих групп животных.

Таким образом, амилоид-индуцированная нейродегенерация способствует увеличению экспрессии протоплазматических *S100beta* астроцитов в субгранулярной зоне зубчатой извилины с интенсивной экспрессией в них инфламмасом. Вместе с тем было показано, что в контрольной группе *S100beta* клетки также экспрессируют инфламмасы.

При иммуногистохимическом исследовании *CD133*+ клеток-предшественниц мы выявили, что экспрессия *CD133*+ клеток статистически значимо не изменялась при моделировании нейродегенерации ( $11,6 \pm 0,74$ ) и при проведении ложной операции ( $13,4 \pm 0,8$ ) ( $p = 0,07$ ), однако наблюдалась тенденция к снижению экс-

прессии данного маркера при введении олигомеров бета-амилоида.

При отсутствии статистически значимых различий в экспрессии *CD133*-позитивных клеток-предшественников мы выявили, что *CD133*+ клетки могут экспрессировать инфламмасы *NLRP3* (рисунок 2). Мы выявили, что при моделировании амилоид-индуцированной нейродегенерации происходит статистически значимое увеличение колокализации этих двух маркеров, что проявляется высоким коэффициентом Пирсона у экспериментальной группы с введением олигомеров бета-амилоида ( $0,86 \pm 0,01$ ) по сравнению с ложно-оперированными животными ( $0,47 \pm 0,07$ ) ( $p = 0,002$ ). Данный факт подтверждают и коэффициенты перекрытия  $0,60 \pm 0,07$  и  $0,94 \pm 0,01$  для амилоид-индуцированной нейродегенерации и группы с введением эквивалентного количества PBS соответственно ( $p = 0,009$ ).

Таким образом, мы отметили, что через 10 дней после инъекции бета-амилоида наблюдаются изменения в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа, которые касаются, прежде всего, увеличения экспрессии протоплазматических *S100beta* астроцитов повышенной экспрессией в них *NLRP3* инфламмасом, но не *CD133*-позитивных клеток.

## Обсуждение

Болезнь Альцгеймера представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое клинически характеризуется прогрессирующей когнитивной дисфункцией, а воспаление играет важную роль в его патогенезе [16].

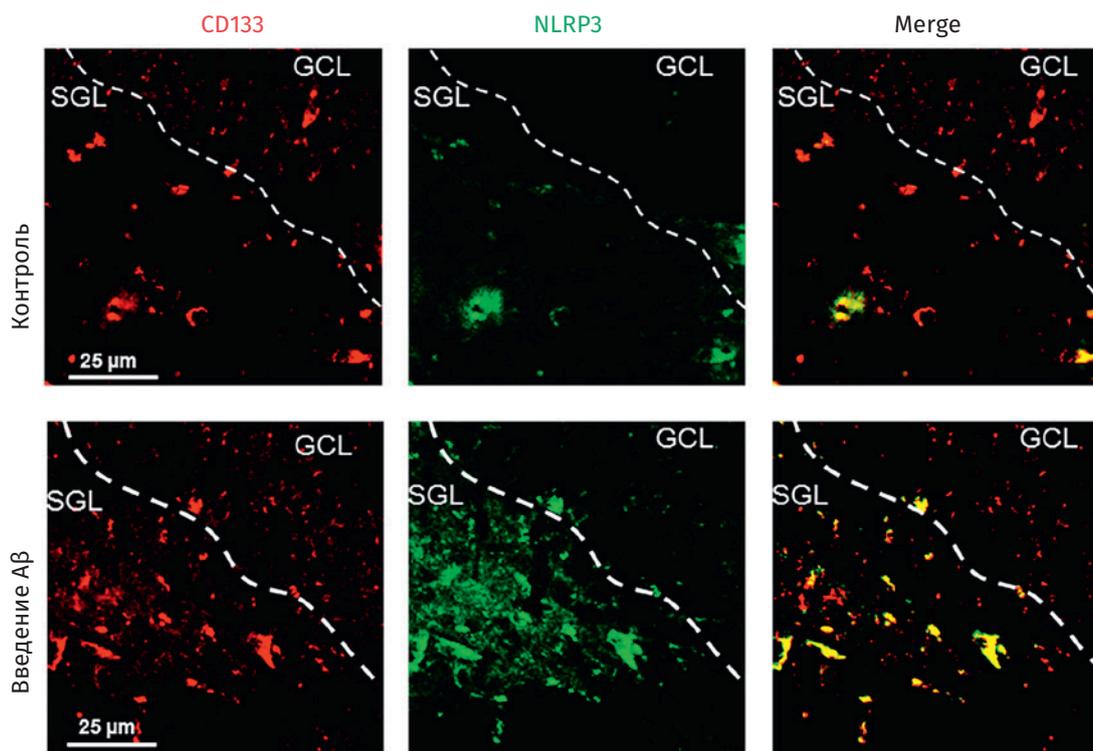


Рисунок 2.

Экспрессия *NLRP3* на *CD133*+ клетках-предшественниках эндотелиоцитов в зубчатой извилине гиппокампа головного мозга в экспериментальных группах. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия *NLRP3*+клеток (зеленый), *CD133*+клеток (красный), Merge изображение показывает колоколизацию *NLRP3* с *CD133* в зубчатой извилине гиппокампа в экспериментальных группах. Сокращения: GCL – гранулярный слой, SGL – субгранулярный слой. Ядра не представлены на рисунке

Figure 2.

Expression of *NLRP3* on *CD133*+ endothelial progenitor cells in the dentate gyrus. *NLRP3*+ cells (green) and *CD133*+ cells (red). GCL is for granular layer, SGL is for subgranular layer

Все большее количество данных свидетельствует о том, что существует тесная связь между нейровоспалительной реакцией и амилоидогенезом. Было показано, что трансгенные мыши с БА имеют более реактивную глию вокруг бляшек  $A\beta$  [17], а также, что нейротоксичность  $A\beta$  может быть усилена микроглией или астроцитами.

Таким образом, при моделировании нейродегенерации мы наблюдаем увеличение числа зрелых астроцитов, экспрессирующих *S100beta*. *S100beta* является кальций-связывающим белком, который продуцируют астроциты. Кроме того, было показано, что уровень астроцитов, экспрессирующих *S100beta*, увеличивается при развитии нейродегенерации, а также данный маркер может быть использован в качестве диагностического при болезни Альцгеймера [18]. *S100beta* экспрессируют преимущественно астроциты, входящие в состав нейроваскулярной единицы головного мозга (т.н. протоплазматические астроциты) [19]. Таким образом, увеличение экспрессии *S100beta* может свидетельствовать о том, что при экспериментальной болезни Альцгеймера *S100beta*-иммунопозитивные (протоплазматические, ассоциированные с нейроваскулярной единицей) астроциты в пределах нейрогенных ниш реагируют на нейротоксическое действие олигомеров бета-амилоида.

За последнее десятилетие было показано, что отложение амилоида- $\beta$  ( $A\beta$ ) в сенильных бляшках сопровождается выраженным хроническим воспалительным ответом [20], что характеризуется высвобождением провоспалительных цитокинов реактивными микроглиальными клетками и, по всей видимости, астроцитами, которые окружают амилоидные отложения. Согласно классической точки зрения, нейровоспаление в патогенезе БА вызывает нейрональную токсичность, приводящую к когнитивным дефицитам [21], но вместе с тем это способствует активации защитных механизмов, поскольку реактивность глиальных клеток увеличивает фагоцитоз и клиренс отложений  $A\beta$  [22].

При нейродегенерации, сопровождающейся нейровоспалением, экспрессия инфламмосом в основном изучалась на клетках микроглии. Несмотря на то, что большинство исследований посвящено возможному влиянию микроглиального воспаления при БА, недавние исследования показывают, что именно астроцитарное воспаление может играть ключевую роль. Так, были обнаружены маркеры воспаления, такие как цитокины, вокруг бета-амилоидных бляшек, характерных для развития болезни Альцгеймера. Кроме того, было убедительно показано, что при нейровоспалении, сопровождающем развитие болезни Альцгеймера,

активируются пути врожденного иммунитета, в том числе *Toll*-подобные рецепторы и *NLRP3* инфламмосомы. Имеются данные, что протофибриллы бета-амилоида непосредственно способствуют формированию и активации инфламмосом [23,24].

По данным некоторых авторов, созревание некоторых цитокинов, таких как *IL-1 $\beta$* , осуществляется инфламмосомами в цитозоле микроглии. Фагоцитоз А $\beta$  активирует *NLRP3* в этих клетках [10], тем самым связывая интернализацию патологических белков с высвобождением провоспалительных цитокинов при нейродегенеративных заболеваниях. Однако до сих пор не было известно, возможна ли экспрессия инфламмосом *NLRP3* клетками, которые экспрессируют *S100beta* при болезни Альцгеймера. Результаты недавних исследований подтверждают, что индукция выраженного воспалительного ответа сопровождается увеличением экспрессии *S100beta* и выделении цитокинов глиальными клетками при прогрессировании рассеянного склероза [25]. Также при этой патологии увеличение экспрессии *S100beta* ассоциировано с повреждением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [26]. Дальнейшие исследования необходимы для подтверждения использования этой молекулы не только в качестве молекулы-маркера нейродегенерации, но и повреждения проницаемости ГЭБ при нейродегенерации.

Таким образом, было показано, что развитие воспаления в ткани головного мозга при нейротоксическом действии бета-амилоида связано с формированием *NLRP3*-инфламмосом в нейрогенной нише головного мозга, что в конечном итоге может приводить к нарушению процессов синаптогенеза, нейрогенеза и ангиогенеза, ассоциированных с репарацией или реализацией когнитивных функций.

Накоплены убедительные доказательства значимой роли локальных воспалительных процессов в прогрессировании БА. Показано, что активация системы комплемента и его провоспалительные последствия участвуют в патогенезе болезни, а связанные с воспалением цитокины сегодня считаются движущей силой невропатологического каскада прогрессирования БА [1].

Весьма важным является изучение как повышение уровня бета-амилоида в головном мозге влияет на эндотелиальные клетки-предшественники, а это, в свою очередь, на процессы

ангиогенеза, структурную целостность ГЭБ и особенности формирования нейровоспаления. Из-за своего стратегического расположения эндотелиальные клетки способны взаимодействовать с другими клетками как в кровотоке, так и в стенке сосуда, в то время как обширная площадь поверхности эндотелия является оптимальным местом для взаимодействия «клетка-клетка» и «клетка-матрикс» [27].

Так было показано, что при церебральной дисфункции, наблюдаемой при нейродегенерации альцгеймеровского типа, механизмы восстановления сосудов и нейронов опосредуются циркулирующими клетками-предшественниками *in vivo*. Однако являются ли *CD133+* клетки-предшественники вовлеченными в патофизиологию БА, до сих пор остается мало изученным. Нами не было зафиксировано достоверного увеличения *CD133+* клеток в зубчатой извилине гиппокампа при введении олигомеров бета-амилоида. Литературные данные также остаются на сегодняшний день весьма противоречивыми. Так, в одном исследовании [28] было отмечено увеличение циркулирующих *CD133*-позитивных клеток в крови пациентов с тяжелой формой деменции по сравнению со здоровыми людьми из группы контроля. Также ранее было показано ступенчатое усиление циркулирующих *CD133+* клеток-предшественников у пациентов с БА, которые могут принимать участие в процессах заживления тканей головного мозга в БА, поэтому этот маркер, возможно, может отражать тяжесть течения процесса.

В другом исследовании [18] у пациентов с БА наблюдали снижение *CD133*-позитивных клеток по сравнению с контрольными субъектами, однако такое наблюдение было статистически незначимым. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у пациентов с БА имелась тенденция к снижению количества циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников. Таким образом, можно было предположить, что функция не только зрелых эндотелиальных клеток нарушается у пациентов с болезнью Альцгеймера, но и маркеры эндотелиальных предшественников могут быть новым биомаркером БА.

Еще одно исследование [29] говорит о том, что популяция *CD133*-позитивных клеток обладает способностью образовывать капиллярные трубки, поэтому возможно использовать данную молекулу для оценки ангиоген-

ного потенциала головного мозга при развитии нейродегенерации.

Тем не менее, наши наблюдения показали, что, несмотря на отсутствие статистически значимых различий в экспрессии *CD133*-позитивных клеток, мы обнаружили увеличение экспрессии инфламмасом *NLRP3* в этих клетках при нейрогенерации, вызванной инъекцией бета-амилоидов. Это в свою очередь может свидетельствовать о том, что функциональная активность этих клеток меняется, реализуя воспалительный фенотип.

Известно, что при воздействии различных раздражителей окружающей среды эндотелиальные клетки подвергаются глубоким изменениям в экспрессии и функции генов, участвующих в многочисленных воспалительных реакциях. В результате эндотелиальные клетки являются мишенью цитокинов, секретируемых другими клетками, а также прямыми генераторами ряда цитокинов вследствие различных факторов и раздражителей, включая гипоксию, окисленные липопротеины, системные/сосудистые инфекции и повреждение сосудистых клеток. Было показано, что среди факторов, влияющих на церебральные эндотелиальные клетки, воздействие  $A\beta$  вызывает массив провоспалительных реакций с повышенной секрецией различных цитокинов, включая провоспалительные медиаторы *IL-1* и *IL-6* [27]. Однако до сих пор до конца не выяснено, каким образом меняется экспрессия инфламмасом в эндотелиальных клетках-предшественниках.

В литературе имеются единичные упоминания о том, что возможно стимулирование ангиогенеза и восстановление функции эндотелиальных клеток путем ингибирования *NLRP3* в эндотелиальных клетках-предшественниках в стрептозоциновой модели сахарного диабета [30]. Известно, что болезнь Альцгеймера также сопровождается развитием локальной инсули-

норезистентности, а нарушение передачи сигналов инсулина, лежащего в основе патогенеза сахарного диабета 2 типа, способствует генерации бета-амилоида в головном мозге животных за счет активации гамма-секретазы и накопления аутофагосом [31].

Следует отметить, что при исследовании микрососудов при болезни Альцгеймера наблюдалось устойчивое повышение уровня воспалительных медиаторов. По сравнению с микрососудами, полученными от контрольной группы, при нейродегенерации были обнаружены более высокие уровни ряда воспалительных факторов, включая оксид азота, тромбин, *TNF- $\alpha$* , трансформирующий фактор роста  $\beta$ , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*, и матриксных металлопротеиназ [32]. В настоящее время одной из наиболее вероятных теорий развития церебральной амилоидной ангиопатии и опосредованной олигомерами бета-амилоида клеточной гибели, являются специфические механизмы, вызванные различными воспалительными медиаторами. Одним из наиболее изученных механизмов является *IL-1*-опосредованный путь, способный усугублять нейропатологические изменения, нейронный стресс и нейровоспаление. Показано, что этот механизм, опосредуемый *IL-1*, вызывает *A*-индуцированный нейронный апоптоз посредством активации *NF $\kappa$ B* пути [33].

## Заключение

Таким образом, синергический эффект глиальной активации с экспрессией *S100beta*, отложения бета-олигомеров, в том числе и в сосудах, а также провоспалительный фенотип клеток-предшественников эндотелиальных клеток объединяются для формирования сложного самоактивирующегося порочного круга, способного приводить к дальнейшей дисфункции нейроваскулярной единицы.

## Литература / References:

1. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001; 81 (2): 741-766.
2. Jorge G, Fossati S, Rostagno A. Amyloidosis Associated with Cerebral Amyloid Angiopathy: Cell Signaling Pathways Elicited in Cerebral Endothelial Cells. *J Alzheimers Dis.* 2014; 42 (03): 167-176.
3. Yamazaki Y, Kanekiyo T. Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (9). pii: E1965.
4. Hall JR, Wiechmann AR., Johnson LA, Edwards M, Barber RC, Winter AS, et al. Biomarkers of Vascular Risk, Systemic Inflammation and Microvascular Pathology and Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2013; 35 (2): 363-371.
5. Komleva YuK, Kuvacheva NV, Malinocskaya NA, Gorina YaV, Lopatina OL, Teplyashina EA, et al. Regenerative potential of the brain: Composition and forming of regulatory microenvironment in neurogenic niches. *Human Physiology.* 2016; 42 (8): 865-873.
6. Salmina AB, Komleva YuK, Lopatina OL, Kuvacheva NV, Gorina YaV, Panina YuA, et al. Astroglial control of neuroinflammation:

- TLR3-mediated dsRNA-sensing pathways are in the focus. *Rev Neurosci*. 2015; 26(2): 143-159.
7. Jo WK, Law AC, Chung SK. The neglected co-star in the dementia drama: the putative roles of astrocytes in the pathogenesis of major neurocognitive disorders. *Mol Psychiatry*. 2014; 19 (2): 159-167.
  8. Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*. 2011; 59 (2): 242-255.
  9. Di Virgilio F. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacol Rev*. 2013; 65 (3): 872-905.
  10. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008; 9 (8): 857-865.
  11. White CS, Lawrence CB, Brough D, Rivers-Auty J. Inflammasomes as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2017; 27 (2): 223-234.
  12. Gorina YaV, Komleva YuK, Lopatina OL, Volkova VV, Gerzog GE, Popova NN, et al. Features of molecule expression markers of insulin resistance in experimental Alzheimer's disease. *Problems of Endocrinology*. 2015; (4): 43-48. Russian (Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Герцог Г.Е., Попова Н.Н. и др. Особенности экспрессии молекул-маркеров инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера // Проблемы эндокринологии. 2015. №4. С. 43-48).
  13. Epelbaum S, Youssef I, Lacor PN, Chaurand P, Duplus E, Brugg B, et al. Acute amnesic encephalopathy in amyloid-β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. *Neurobiol Aging*. 2015; 36 (6): 2043-2052.
  14. Paxinos G, Franklin K. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th Edition. Imprint: Academic Press. 2012. P. 360.
  15. Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem*. 2007; 40: 101-111.
  16. Saresella M, Marventano I, Calabrese E, Piancone F, Rainone V, Gatti A, et al. A complex proinflammatory role for peripheral monocytes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014; 38 (2): 403-413.
  17. Birch AM, Katsouri L, Sastre M. Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2014; 11: 25.
  18. Chaves ML, Camozzato AL, Kohler C, Kaye J. Predictors of the progression of dementia severity in brazilian patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Alzheimers Dis*. 2010; 2010. pii: 673581
  19. Morgun AV, Malinovskaya NA, Komleva YuK., Lopatina OL, Kuvacheva NV, Panina YuA, et al. Structural and functional heterogeneity of astrocytes of the brain: a role in neurogenesis and neuroinflammation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2014; (5): 138-148. Russian (Моргун А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Кувачева Н.В., Панина Ю.А. и др. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга: роль в нейрогенезе и нейровоспалении // Бюллетень сибирской медицины. 2014. №5. С. 138-148).
  20. McGeer PL, McGeer EG. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol*. 2013; 126 (4): 479-497.
  21. Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2010; 117 (8): 919-947.
  22. Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*. 2010; 33 (10): 1539-1556.
  23. Terrill-Usery SE, Mohan MJ, Nichols MR. Amyloid-β(1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1β despite significant intracellular IL-1β accumulation in microglia. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842 (11): 2276-2285.
  24. Goldmann T, Tay TL, Prinz M. Love and death: microglia, NLRP3 and the Alzheimer's brain. *Cell Res*. 2013; 23 (5): 595-596.
  25. Barateiro A, Afonso V, Santos G, Cerqueira JJ, Brites D, van Horsen J, et al. S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2016; 53 (6): 3976-3991.
  26. Koh SX, Lee JK. S100B as a marker for brain damage and blood-brain barrier disruption following exercise. *Sports Med*. 2014; 44 (3): 369-385.
  27. Vukic V, Callaghan D, Walker D, Lue LF, Liu QY, Couraud PO, et al. Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiol Dis*. 2009; 34: 95-106.
  28. Stellos K, Panagiota V, Sachsenmaier S, Trunk T, Straten G, Leyhe T, et al. Increased circulating progenitor cells in Alzheimer's disease patients with moderate to severe dementia: evidence for vascular repair and tissue regeneration? *J Alzheimers Dis*. 2010; 19 (2): 591-600.
  29. Akita M, Tanaka K, Matsumoto S, Komatsu K, Fujita K. Detection of the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Marker CD133 during Angiogenesis in Three-Dimensional Collagen Gel Culture. *Stem Cells Int*. 2013; 2013: 927403.
  30. Deng Y, Han X, Yao Z, Sun Y, Yu J, Cai J, et al. PPARα Agonist Stimulated Angiogenesis by Improving Endothelial Precursor Cell Function Via a NLRP3 Inflammasome Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42 (6): 2255-2266.
  31. Son SM, Song H, Byun J, Park KS, Jang HC, Park YJ, et al. Accumulation of autophagosomes contributes to enhanced amyloidogenic APP processing under insulin-resistant conditions. *Autophagy*. 2012; 8: 1842-1844.
  32. Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2011; 8: 26.
  33. Wilcock DM, Griffin WS. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation*. 2013; 10: 84.

## Сведения об авторах

**Черных Анатолий Игоревич**, врач-хирург, КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница №20 им. И.С. Берзона; соискатель, НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия.

**Вклад в статью:** организация и участие в проведении исследования, оформление статьи.

## Authors

**Dr. Anatoly I. Chernykh**, MD, Surgeon, Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Hospital № 20 named after I.S. Berzon, Krasnoyarsk, Russian Federation; Research Fellow, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Contribution:** conceived and designed the study; performed the experiments; wrote the manuscript.

**Комлева Юлия Константиновна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, старший научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия.

**Вклад в статью:** организация и участие в проведении исследования, помощь в оформлении статьи.

**Горина Яна Валерьевна**, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия.

**Вклад в статью:** организация и участие в проведении исследования.

**Лопатина Ольга Леонидовна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, старший научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия.

**Вклад в статью:** организация и участие в проведении исследования, консультативная помощь.

**Пащенко Светлана Ивановна**, ассистент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия.

**Вклад в статью:** консультативная помощь.

**Салмина Алла Борисовна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия.

**Вклад в статью:** консультативная помощь.

#### **Корреспонденцию адресовать:**

Комлева Юлия Константиновна  
660022, Красноярский край, Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, 1,  
e-mail: yuliakomleva@mail.ru

**Выражение благодарности:** работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (НШ-6240.2018.7).

Статья поступила: 06.02.18г.

Принята к печати: 01.03.18г.

**Dr. Yuliya K. Komleva**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation; Senior Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Contribution:** conceived and designed the study; performed the experiments; wrote the manuscript.

**Dr. Yana V. Gorina**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation; Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Contribution:** conceived and designed the study; performed the experiments.

**Dr. Olga L. Lopatina**, PhD, Associate Professor, Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation; Senior Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Contribution:** conceived and designed the study; performed the experiments.

**Dr. Svetlana I. Paschenko**, Assistant Professor, Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Contribution:** performed the experiments; wrote the manuscript.

**Prof. Alla B. Salmina**, MD, PhD, Head of the Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation; Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Contribution:** wrote the manuscript.

#### **Corresponding author:**

Dr. Yuliya K. Komleva,  
Partizana Zheleznyaka Street, 1, Krasnoyarsk,  
660022, Russian Federation  
e-mail: yuliakomleva@mail.ru

**Acknowledgements:** this study was financially supported by a grant of the President of the Russian Federation for State Support of the Leading Scientific Schools of the Russian Federation (SS-6240.2018.7).