

Научно исследовательская работа

Тема: Модуляция аутофагии как перспективный мультицелевой подход к экспериментальной терапии нейродегенеративных нарушений на анимальных моделях болезни Альцгеймера

Выполнил:

Цвира Андрей Евгеньевич,

ученик 11Б класса

Российской Федерации, Новосибирской обл., г. Новосибирска,

МБОУ Лицея №22 «Надежда Сибири»

Научный руководитель:

Амстиславская Тамара Геннадьевна,

доктор биологических наук,

заместитель директора по научной работе

Научно-Исследовательского Института Нейронаук и Медицины

Российская Федерация, г. Новосибирск

Новосибирск – 2022

Содержание

Введение	3
1. Литературный обзор.....	4
2. Материалы и методы.....	7
3. Полученные результаты.....	10
4. Выводы.....	12
5. Заключение.....	13
6. Список литературы.....	13

Введение

С увеличением продолжительности жизни населения резко возросла встречаемость тяжелых когнитивных дисфункций, вызванных нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера поэтому в настоящее время деменции пожилых лиц являются одной из актуальнейших проблем современной медицины.

Однако, у нашего организм есть довольно много способов самозащиты, усиливая которые мы можем оказывать существенное влияние на формирование и лечение нейродегенеративных заболеваний. Одним из таких способов является процесс аутофагии. Аутофагия отчищает клетку от неправильно агрегированных белков, поврежденных органелл и т.д.

Цель проекта: оценить совместное влияние индукторов аутофагии на экспрессию генов маркеров (*Lc3b*, *Becn1*, *Park2*) активации разных звеньев аутофагии на примере анимальной модели болезни Альцгеймера, что позволит исследовать вовлечение данных процессов в механизмы коррекции нейродегенеративных нарушений.

Гипотеза работы: совместное применение индукторов аутофагии (рапамицина и трегалозы) вызывает более активную экспрессию генов в клетках, чем их применение отдельно друг от друга.

Задачи проекта:

1. Освоить метод интрацеребрального введения раствора фрагмента A β 25-35, и на основе данного метода сформировать экспериментальные группы мышей C57BL/6 с альцгеймероподобной патологией
2. С помощью метода qPCR (кПЦР) провести изучение экспрессии генов *Lc3b*, *Becn1*, *Park2* в гиппокампе мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера при совместном и раздельном действии рапамицина и трегалозы.

Актуальность: многочисленные данные указывают, что модуляция аутофагии существенно влияет на формирование и лечение нейродегенеративных заболеваний, поэтому актуальность разработки различных вариантов терапевтической активации аутофагии не вызывает сомнений

Новизна проекта заключается в том, что эффективность совместной активации аутофагии с помощью m-TOR-зависимых и m-TOR-независимых путей будет рассмотрена *in vivo*.

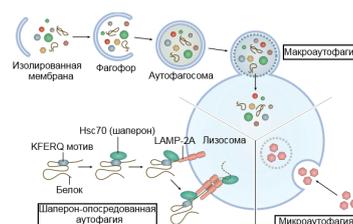
1. Обзор литературы

Аутофагия.

Аутофагия — это адаптационный механизм клетки, позволяющий переваривать собственные компоненты, чтобы повторно использовать их материал.

Согласно современным данным, аутофагия подразделяется на три типа: микроаутофагия, шаперон-зависимая аутофагия, макроаутофагия. [1] (рисунок 1)

Рисунок 1 — Схематичное изображение типов аутофагии.



Макроаутофагия.

Аутофагосома окружает двойной мембраной помеченные для уничтожения органеллы, затем аутофагосомы сливаются с лизосомами, образуя аутофаголизосомы, в которых происходит дальнейшая деградация.

Микроаутофагия.

Микроаутофагия – это неселективный лизосомальный путь деградации, где путем инвагинации мембраны формируется эндосома, содержащая

участок цитоплазмы, которая созревает до лизосомы, в которой в дальнейшем происходит деградация.

Шаперон-зависимая аутофагия.

Шаперон-зависимая аутофагия – высокоселективный тип аутофагии по отношению к белкам. При участии белков-шаперонов происходит направленный транспорт белков из цитоплазмы в лизосому, где они подвергаются деградации.

Причины аутофагии.

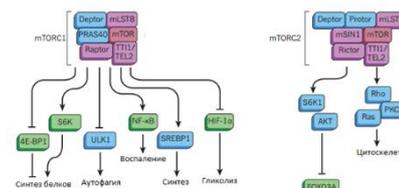
Наиболее типичным спусковым механизмом, вызывающим аутофагию, является голодание клетки, при котором обнаруживается недостаток какого-либо питательного вещества. [2]

Считается, что сигналы аминокислот, инсулина и факторов роста сходятся на mTOR, который является основным регулятором передачи сигналов питательных веществ. Путь mTOR является центральным регулятором метаболизма и физиологии млекопитающих. mTOR входит в состав двух комплексов: mTORC1 и mTORC2. (рисунок 2)

mTORC1 – комплекс, функционирующий как датчик питательных веществ/энергии и контролирует синтез белка. [3]

mTORC2 играет ключевую роль во многих клеточных процессах таких как метаболизм глюкозы, апоптоз, пролиферация клеток, транскрипция и миграция клеток. [4]

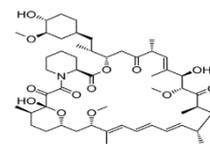
Рисунок 2 — Схематичное изображение, состава комплексов mTORC1 и mTORC2.



mTOR зависимый путь активации аутофагии.

Рапамицин (сиролимус) ингибирует белок mTOR, связываясь со своим внутриклеточным рецептором FKBP12, запуская аутофагии. [5] (рисунок 3)

Рисунок 3 — Структурная формула рапамицина.



mTOR независимый путь активации аутофагии.

При активации mTOR независимого пути аутофагия происходит стимуляция аутофагию через увеличение уровня белка LC3-II. Для активации этого пути аутофагии используется трегалоза. [6] (рисунок 4)

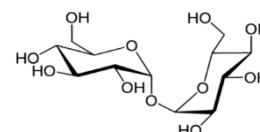


Рисунок 4 — Структурная формула трегалозы.

Гены ответственные за аутофагию.

Lc3b — ген, главным образом ответственный за образование аутофагосом.

Becn1 — центральный ген, регулирующий аутофагию. Считается, что этот ген играет роль во многих клеточных процессах, включая нейродегенерацию и апоптоз.

Park2 — ген, играющий важную роль в митофагии. Известно, что мутации данного гена вызывают болезнь Паркинсона.

Болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера — болезнь, которая приводит к разрушению нервных структур, вызывая нарушения мозговой деятельности. Принято считать, что формирование болезни связано с накоплением и агрегацией неправильно свернутого белка амилоида-бета (рисунок 5,6) в сенильные бляшки. [7]

Рисунок 5 — Схематичное изображение, образования амилоида-бета из его белка-предшественника (трансмембранного белка (APP))

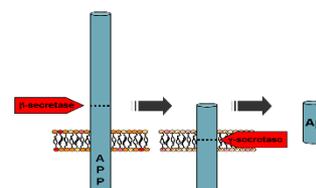


Рисунок 6 — Схематичное изображение прогрессии нейродегенерации при болезни Альцгеймера



2. Материалы и методы

Объект исследования и экспериментальный дизайн.

Работа выполнена на 50 половозрелых самцах мышей линии C57Bl/6 с массой тела 25 ± 2 г. Содержание животных и экспериментальные процедуры соответствовали правилам NIH (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Были приложены все усилия для минимизации количества животных в группах и их страданий.

Работа выполнена на базе Научно-Исследовательского Института Нейронаук и Медицины. Животные выращены в виварии Научно-исследовательского института.

Подготовка групп, введение препаратов и полимеразная цепная реакция выполнены автором лично.

Мыши были разделены на пять групп (по 10 животных в каждой):

1. Контроль (H₂O) (билатеральное введение стерильной воды в боковые желудочки мозга);
2. «A β 25-35» (билатеральное введение фрагмента A β 25-35 в боковые желудочки мозга);
3. «A β 25-35+рапамицин» (билатеральное введение фрагмента A β 25-35 в боковые желудочки мозга и внутрибрюшинное введение 10 мг/кг рапамицина (MedChem Express, США) в растворителе (5% Tween 80+5% PEG-400), 7х, через день);

4. «Аβ25-35+трегалоза» (билатеральное введение фрагмента Аβ 25-35 в боковые желудочки мозга и введение трегалозы (2% раствор с питьем в течение 14 дней);
5. «Аβ25-35+рапамицин+трегалоза» (билатеральное введение фрагмента Аβ 25-35 в боковые желудочки мозга и внутривентрикулярное введение 10 мг/кг рапамицина (MedChem Express, США) в растворителе, 7х, через день, на фоне введения 2% раствора трегалозы (Токуо Chemical Industry, Япония) с питьем в течение 14 дней).

Терапию индукторами аутофагии начинали через день после центрального введения Аβ25-35, проводили в течение 2 недель, затем через день производили забор биообразцов. (таблица 1)

Таблица 1 — Дизайн эксперимента

День 0	День 2-16	День 18
билатеральное введение в боковые желудочки мозга фрагмента Аβ25-35	введения индукторов аутофагии в соответствии с выше изложенным планом	Забор биообразцов

Инъекции Аβ 25-35.

Вещество «фрагмент амилоида-бета 25–35» (Amyloid Beta-Protein Fragment 25-35; Sigma) растворяли в стерильной воде до концентрации 1 мг/мл и хранили при –20°C до использования. Перед введением животным приготовленный раствор размораживали и инкубировали для образования агрегированных форм 4 дня при 37°C. Мышей наркотизировали введением 2,5 % раствора авертина, место инъекции дезинфицировали 70% раствором этанола. Инъекции производили в соответствии с опубликованными ранее протоколами с небольшими модификациями [8] [9]. Раствор амилоида вводили билатерально шприцом Hamilton (25 мкл, модель 1702 RN SYR, с иглой 22s ga, 2 дюйма), с помощью микропомпы (скорость введения 0,8 мкл/мин), иглу оставляли в месте инъекции в течение еще 1 мин после

введения. Вводили по 5 мкл раствора в каждый желудочек. Координаты введения: AP= -0.5 мм, ML=1 мм, DV= -3 мм.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (кПЦР; qPCR).

Относительное количество целевой мРНК измеряли с помощью кПЦР в соответствии со следующей процедурой.

Проводили экстракцию общей РНК из образцов гиппокампа головного мозга (помещенных в раствор для стабилизации РНК (*RNAlater* Invitrogen) и хранимых при -20 ° С) с использованием набора RNA Mini Kit (Invitrogen от Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Затем провели синтез кДНК в объеме 25 мкл из исходной 1 мкг РНК с использованием набора для обратной транскрипции (Syntol, Россия) согласно инструкции производителя. Обратная транскрипция осуществлялась с использованием случайных праймеров.

Затем конструировались последовательности специфических праймеров (с использованием Primer 3 (NCBI)) и анализ отобранных вариантов на совместимость температур отжига и возможную димеризацию олигонуклеотидов (OligoAnalyzer) для референсных генов (*Ppia*, *B2m*) и генов-мишеней аутофагии (*Lc3b*, *Becn1*, *Park2*). Были использованы пары праймеров, располагающихся на разных экзонах (или их стыках), для исключения участия в ПЦР остаточной геномной ДНК. Химический синтез праймеров проводился в компании Биосинтез (Новосибирск). (таблица 2)

Название гена	Последовательность(5'-3')		Размер ампликона
Гены домашнего хозяйства (референсные гены)			
<i>B2m</i>	GTCTTTCTATATCCTGGCTCA	ATGCTTGATCACATGTCTCG	129
<i>Ppia</i>	AAAGTTCCAAAGACAGCAGAAAA	GCCAGGACCTGTATGCTTTAG	207
Гены роскоши (целевые гены, таргетные гены)			
<i>LC3B</i>	AAAGAGTGGAAGATGTCCGGC	ACCAGGAACTTGGTCTTGTC	118
<i>Park2</i>	GGTCCAGTTAAACCCACCTAC	TTAAGACATCGTCCCAGCAAG	154
<i>Becl1</i>	GAACCTCACAGCTCCATTACTTA	ATCTTCGAGAGACACCATCC	121

Таблица 2 — последовательности оригинальных специфических праймеров для мышей.

Уровень экспрессии генов-мишеней и референсных генов оценивали на термоциклере кПЦР-ОТ LightCycler-480 ii (Roche, Швейцария) с использованием набора реагентов Syntol (Россия) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR-GREEN. Численные значения величин уровней мРНК целевых и референсных генов определяли в 3-х технических повторах по результатам ПЦР каждой пробы с помощью программного обеспечения LightCycler 480 Software (Release 1.5.1) и стандартных кривых, построенных по значениям ПЦР заданных концентраций кДНК калибратора, в качестве которого служил суммарный раствор кДНК из всех экспериментальных образцов этой структуры. Для проведения межгрупповых сравнений и статистической обработки выявленные уровни мРНК целевых генов индивидуальных проб были нормализованы на соответствующие значения экспрессии референсного гена *B2m*.

Статистический анализ.

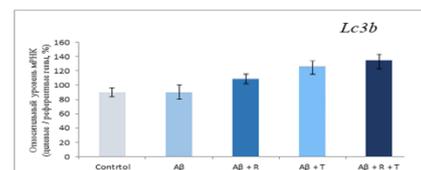
Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for WINDOWS методами дисперсионного анализа и post-hoc сравнений.

3. Полученные результаты

Двухнедельное введение рапамицина и трегалозы положительно повлияло на транскрипцию генов аутофагии в гиппокампе мышей с моделью болезни Альцгеймера.

При раздельном применении трегалоза активировала экспрессию гена *Lc3b* более активно, чем рапамицин. Совместное введение индукторов аутофагии несколько активнее индуцировало экспрессию данного гена, по сравнению с трегалозой. (диаграмма 1)

Диаграмма 1 — Влияние индукторов аутофагии (рапамицин, трегалоза) на экспрессию мРНК гена *Lc3b*, в гиппокампе мозга мышей линии C57Bl/6 на фоне нейротоксического действия Аβ



Введение рапамицина активировало более активную транскрипцию генов *Becn1* и *Park2*, чем применение трегалозы, при раздельном применении индукторов аутофагии. Совместное использование рапамицина и трегалозы индуцировало более активную экспрессию генов в обоих случаях. (диаграмма 2, диаграмма 3)

Диаграмма 2 — Влияние индукторов аутофагии (рапамицин, трегалоза) на экспрессию мРНК гена *Becn1*, в гиппокампе мозга мышей линии C57Bl/6 на фоне нейротоксического действия Аβ

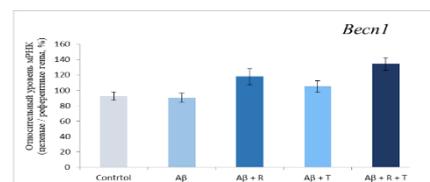
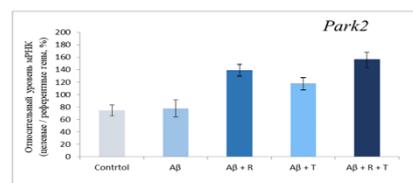


Диаграмма 3 — Влияние индукторов аутофагии (рапамицин, трегалоза) на экспрессию мРНК гена *Park2*, в гиппокампе мозга мышей линии C57Bl/6 на фоне нейротоксического действия Аβ



Основываясь на выше изложенных результатах можно сказать, что стимуляция mTOR-зависимой аутофагии рапамицином вызывала сильную активацию экспрессии генов аутофагии (*Becn1*, *Park2*) в гиппокампе мозга мышей линии C57Bl/6 на фоне нейротоксического действия Аβ. Было трудно сравнить активацию с аналогичными результатами из литературы из-за различий в условиях эксперимента. В любом случае, данный путь хорошо

изучен и дает положительные терапевтические результаты [10], несмотря на то, что он ингибирует клеточный метаболизм и ослабляет иммунную систему.

Положительные результаты активации независимой от mTOR аутофагии многочисленны [11]. В нашей работе трегалоза вызывала более активную экспрессию гена *Lc3b* по сравнению с рапамицином. Однако, экспрессия генов *Becn1* и *Park2* была слабее, чем при использовании рапамицина.

Следует отметить, что эффект при комбинировании лекарств был значительно выше, чем отдельные эффекты. В определенной мере данный результат находится в соответствии со стратегией мультицелевого терапевтического воздействия на организм, когда применение препаратов с различными механизмами действия для поражения различных патогенетически важных мишеней приносит качественно новый результат, существенное повышение терапевтического эффекта [12]. Важно, что в мировой литературе терапевтическое действие препаратов исследовалось при их отдельном применении, хотя согласно некоторым исследованиям, их совместное действие на культуре нейроноподобных клеток дает аддитивный эффект [13].

4. Выводы

1. Был освоен метод интрацеребрального введения раствора фрагмента A β 25-35, а также сформированы экспериментальные группы мышей C57BL/6 с альцгеймероподобной патологией.
2. С помощью метода qPCR (кПЦР) было проведено изучение экспрессии генов *Lc3b*, *Becn1*, *Park2* в гиппокампе мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера. На основе полученных результатов можно сказать, что совместное применение рапамицина и трегалозы вызывало более активную экспрессию генов, чем их отдельное введение.

5. Заключение

Введение рапамицина и трегалозы как отдельно, так и совместно, оказалось способным положительно повлиять на транскрипцию генов аутофагии (Lc3b, Vecn1, Park2) в гиппокампе мышей линии C57BL/6 с моделью болезни Альцгеймера.

Важно отметить, что лечение экспериментальной модели болезни Альцгеймера активацией аутофагии, комбинацией индукторов аутофагии различного механизма действия, применяется впервые. Ранее рапамицин и трегалоза использовались по отдельности в отношении моделей болезни Альцгеймера.

Оба исследованных препарата (рапамицин и трегалоза) являются разрешенными к медицинскому использованию, поэтому в дальнейшем важно разработать оптимальный режим их применения и исследовать возможные побочные эффекты и осложнения на другие органы

В целом, получены ответы на вопросы о возможности использования рапамицина и трегалозы для терапии болезни Альцгеймера на анимальной модели заболевания. Получены основания для исследования оптимальных условий и режимов терапевтического применения этих индукторов аутофагии на генетических моделях болезни Альцгеймера, приближенных к болезни человека.

6. Список литературы

1. G. Farrugia, R. Balzan. Oxidative stress and programmed cell death in yeast // doi:10.3389/fonc.2012.00064.
2. T. Noda, Y., Ohsumi Tor. a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast // doi: 10.1074/jbc.273.7.3963.

3. Do-Hyung K., D. Sarbassov. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery // doi: 10.1016/s0092-8674(02)00808-5.
4. D. Sarbassov, D. Guertin, S. Ali. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex // doi: 10.1126/science.1106148.
5. S. Huang, M. Bjornsti. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance // doi: 10.4161/cbt.2.3.360.
6. S. Mordier, C. Deval, M. Ferrara. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway // doi: 10.1074/jbc.M003633200
7. J. Hardy, D Allsop. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease // doi: 10.1016/0165-6147(91)90609-v
8. A. L. Choi, P. Grandjean, G. Sun, Y. Zhang. Developmental fluoride neurotoxicity: // doi: 10.1289/ehp.1206192R.
9. S. Park, S. P Gygi, D. Finley. Structural defects in the regulatory particle-core particle interface of the proteasome induce a novel proteasome stress response // doi: 10.1074/jbc.M111.285924.
10. B. Boland, A. Kumar, S. Lee, J. Wegiel. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease // doi: 10.1523/JNEUROSCI.0800-08.2008.
11. K. Hosseinpour-Moghaddam, M. Caraglia, A. Sahebkar. Autophagy induction by trehalose: Molecular mechanisms and therapeutic impacts. // doi: 10.1002/jcp.26583
12. K. Sahoo, B. Sahoo, A. Kumar, N.Yasin, R. Kumar. Childhood obesity: causes and consequences. // doi: 10.4103/2249-4863.154628.
13. A. Sarkar , N. Parikh, S. Hearn, S. Tazuke, C. Schulz. Antagonistic roles of Rac and Rho in organizing the germ cell microenvironment. // doi: 10.1016/j.cub.2007.06.048.