

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-235

ОЦЕНКА ТИПА АКТИВАЦИИ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *IN VITRO***ASSESSMENT OF THE ACTIVATION TYPE OF GLIAL CELLS AND THE STATE OF MITOCHONDRIA IN ALZHEIMER'S DISEASE MODELING *IN VITRO***

А. А. Ермошина, А. Д. Охальников, А. О. Моторина, М. С. Гавриш, А. А. Бабаев

*Научно-исследовательский институт нейронаук,
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского*

A. A. Ermoshina, A. D. Okhalknikov, A. O. Motorina, M. S. Gavrish, A. A. Babaev

Research Institute of Neurosciences, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ ermoshina.aa@yandex.ru

Аннотация

Болезнь Альцгеймера — наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание. По новым данным, митохондрии принимают активное участие в патогенезе болезни Альцгеймера, при этом в органоидах накапливаются нарушения. Считается, что есть связь между накоплением дефектов митохондрий и воспалением. Нами было проведено исследование типа активации глиальных клеток, оценка паттернов экспрессии структурных митохондриальных генов, генов ауто- и митофагии.

Abstract

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease. According to new data, mitochondria are actively involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, while disorders accumulate in organoids. It is believed that there is a link between the accumulation of mitochondrial defects and inflammation. We conducted a study of the type of glial cell activation, evaluation of the expression patterns of structural mitochondrial genes, auto- and mitophagy genes.

Болезнь Альцгеймера — наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, численность больных составляет около 47,5 млн человек во всем мире. В настоящее время все большую популярность приобретает теория митохондриального каскада. При этом считается, что дисфункция митохондрий сильно связана с воспалительными процессами, которые возникают еще на ранних стадиях болезни.

Цель работы — оценить состояние глиальных клеток посредством оценки уровня экспрессии ряда генов, ответственных за воспаление и состояние митохондрий при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro*.

В качестве экспериментальной модели были выбраны мыши линии 5xFAD. Мыши 5xFAD экспрессируют человеческие белки APP и PSEN1 с пятью мутациями, связанными с ускоренным амилоидозом, под контролем промотора Thy1.2. Носители обоих трансгенов были отнесены в опытную группу FAD, в качестве контроля выступали мыши линии 5xFAD, не несущие трансгенов, — группа WT.

Для проведения экспериментов использовали первичные смешанные глиальные культуры коры головного мозга, полученные от новорожденных (P0–P2) мышей линии 5xFAD, предварительно разделенные на экспериментальные группы по результатам генотипирования — носители обоих трансгенов APP и PSEN1 были отнесены в опытную группу FAD, в качестве контроля выступали мыши линии 5xFAD, не несущие трансгенов — группа WT. На 14, 21 и 28-й дни культивирования (DIV) проводилось выделение тотальной РНК из культур для дальнейшего анализа с помощью ПЦР в режиме реального времени. Обработку результатов проводили с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и референсного гена, кодирующего антизим орнитиндекарбоксилазу 1 (*oaz1*). Статистическая обработка проводилась при помощи GraphPad Prism.

При анализе динамики экспрессии генов противовоспалительных цитокинов были выявлены статистически значимые различия в виде повышения уровня экспрессии гена *il10* в группе FAD (21, 28 DIV) и снижения уровня экспрессии гена *il4* в группе FAD на 28 DIV, гена рецептора *trem2* в группе WT (21, 28 DIV). Между уровнями мРНК провоспалительных генов в группах FAD, WT и 14 DIV не было выявлено статистически значимых различий.

Был сделан вывод, что в смешанной глиальной культуре в группе FAD не произошло предполагаемого переключения профиля экспрессии на воспалительный. Возможно, это связано с тем, что нами рассматривалась

смешанная культура. В целом она несет в себе несколько типов клеток, каждый из которых мог по-разному ответить на процессы, происходящие при моделировании болезни Альцгеймера.

В рамках эксперимента оценивали уровни экспрессии митохондриальных структурных генов *drp1*, *ora1* и *mfn2*, аутофагических генов *sqstm1* и *lc3b* и митофагического гена *pink1* в смешанных глиальных культурах на 14, 21 и 28 DIV.

Можно отметить изменение профиля экспрессии в группе FAD на 28 DIV: происходит снижение уровня экспрессии гена *drp1* (напрямую влияет на частоту делений митохондрий) и повышение уровня экспрессии гена *mfn2* (влияет на частоту слияний митохондрий). Соответственно, подобные изменения позволяют предположить, что митохондрии в опытной группе чаще сливаются и реже делятся, чем в контрольной. На основании литературных данных наблюдаемые изменения можно связать с присутствием в среде A β , который увеличивает активность белка DRP1. Повышение уровня Mfn2 в некоторых исследованиях отмечалось как характерная черта для начальной стадии болезни Альцгеймера. Следовательно, подобные результаты могут отображать начало патологических процессов в модели болезни Альцгеймера.

Таким образом, при моделировании болезни Альцгеймера не выявлено воспалительных процессов в смешанной глиальной культуре на исследуемых сроках культивирования. Уровень экспрессии гена *drp1* на 28 DIV снизился в 1,88 раза, а уровень экспрессии гена *mfn2* увеличился в 2,39 раза по сравнению с уровнем экспрессии этих генов в группе FAD на 14 DIV, что является показателями ранних процессов, предшествующих патологическим.