

УДК 577.352.27

DOI: 10.15587/2519-8025.2017.113525

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА НАНОКРИСТАЛЛОВ ГАЛЛУАЗИТА НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

© С. В. Буряченко

Изучено нейропротекторное взаимодействие нанокристаллов галлуазита на восстановление нейронов, стимулирующее действие на центральные дофаминовые рецепторы, ингибирования агрегации β -амилоидных белков. Молекулы галлуазита характеризуются высокой липофильностью, сильным сродством к электрону, большой сферической поверхностью и способностью к самоассоциации с образованием кластеров, что обуславливает его многие биологические эффекты. Показаны выраженные нейропротекторные свойства нанокристаллов галлуазита

Ключевые слова: нейропротекторный, нанокристаллы, галлуазит, антиоксидантный, нанотрубки, амилоидогенез

1. Введение

Болезнь Альцгеймера – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, наиболее распространенная форма деменции. Течение болезни характеризуется длящимся годами неуклонным ухудшением состояния больного, быстрой инвалидизацией с потерей способности к самостоятельной жизнедеятельности и, в конечном итоге, гибелью нейронов [1]. В рамках наиболее распространённой амилоидной гипотезы считается, что важную роль в запуске необратимых изменений в мозге пациента играет пептид А β 42. Эта форма способна образовывать олигомеры и нерастворимые скопления значительного числа монопептидов в структуре бета-складки, которые получили название амилоидных бляшек [2]. Амилоидные бляшки вызывают патологические изменения в мозге больного, которые проявляются в образовании нейрофибриллярных клубков, нарушении синаптической передачи, гибели нейронов и возникающей вследствие этого деменции [3]. По современным представлениям, А β 42 запускает сложный комплекс процессов на биохимическом и клеточном уровнях, которые в конечном счёте приводят к нейродегенеративным изменениям в мозге [4]. Для снижения уровня А β 42 ведётся поиск препаратов, которые препятствуют его образованию в мозге или удаляют уже образовавшиеся бляшки в тканях. Эти исследования проводятся по трём основным направлениям: как воспрепятствовать образованию А β 42, как очистить уже накопившиеся бляшки А β 42 и как предотвратить олигомеризацию А β 42. В 1995 году исследователям удалось вывести линию трансгенных мышей с мутантным человеческим геном APP, в мозге которых накапливались амилоидные бляшки. Эти мыши хуже справлялись с задачами, в которых требовалось запоминание информации, и они стали моделью для изучения действий перспективных противоамилоидных препаратов [5]. Однако до сих пор никакие препараты, испытывавшиеся на мышах, не показали свою эффективность на людях. Одной из возможных причин неудач переноса результатов исследований на мышах на человека может быть различие в нейрохимии и патофизиологии мышинных и человеческих нейронов. В связи с этим исследования фундаментальных механиз-

мов патогенеза БА приобретают большое значение. Понимание молекулярных основ патологии необходимо не только для разработки методов терапии, но и ранней диагностики, которая крайне затруднена длительным течением бессимптомного этапа болезни. Бляшки образованы главным образом бета-амилоидным пептидом (А β), имеющим молекулярную массу 4 кДа и длину около 40 аминокислотных остатков [6]. А β представляет собой фрагмент трансмембранного белка предшественника бета-амилоида APP (amyloidprecursorprotein) обнаруженного во многих тканях, включая синапсы нейронов. Стратегии создания лекарственных препаратов, направленных на предотвращение накопления амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера, включают снижение концентрации амилоидогенных белков [7].

2. Литературный обзор

Одним из факторов, приводящим к гибели нервных клеток и когнитивным нарушениям, является патологическое накопление в ткани мозга агрегатов β А пептида, являющегося основным компонентом сенильных бляшек – характерных морфологических признаков БА. А β , являясь продуктом протеолитического расщепления APP, имеет ярко выраженные фибриллогенные свойства, и его олигомеры являются токсичными для нервных клеток, вызывая их дегенерацию и гибель [8]. Это обусловлено образованием неправильно свернутыми белками или пептидами высокоорганизованных фибриллярных агрегатов, или амилоидных фибрилл [9]. Амилоидные фибриллы представляют собой протяженные β -складчатые листы, в которых β -тяжи расположены перпендикулярно оси фибриллы (кросс- β -структура). В связи с патологической и функциональной ролью амилоидных фибрилл, особую актуальность приобретают исследования, направленные на усовершенствование и поиск методов детектирования фибриллярных агрегатов и их восстановление с возможностью коррекции нейропротекторного эффекта. Нейротоксичность амилоидных пептидов проявляется нарушением Ca^{2+} -гомеостаза, индукцией окислительного стресса, эксайтотоксичностью, воспалительными процессами, интенсификацией апоптоза. Последний эффект может быть, в частности, реализован путем индукции

открытия митохондриальных пор. В последнем случае гибель клеток может происходить также и по механизму некроза [10]. Для этого заболевания характерны мутации упомянутых генов – APP, PSN-1 и PSN-2. Риск возникновения спорадической формы бета – амилоидных белков в настоящее время связывают с усиленной экспрессией в тканях мозга гена аполипопротеина E (APOE). Было показано, что APOE связывается с Aβ и вместе с ним образует сенильные бляшки [11].

3. Цели и задачи статьи

Цель исследования – изучение нейропротекторных антиоксидантных свойств нанотубулярного галлуазита с возможностью создания нового нейропротекторного препарата для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний головного мозга на основе состава нанокристаллов галлуазита.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить терапевтический эффект на нейрогенез нейронов при применении нанокристаллов галлуазита;
- 2) выявить возможность антиоксидантной защиты нейронов от свободных радикалов;
- 3) изучить молекулярный процесс восстановления нейронов нанокристаллами галлуазита;
- 4) выявить восстановление синтеза амилоидных белков;
- 5) изучить способность нанокристаллов галлуазита восстанавливать мутированные гены APP, PSN-1 и PSN-2;
- 6) изучить биохимический путь влияния нанотубулярного галлуазита на нейрогенез.

4. Материалы и методы

Для достижения полученных результатов нами у лабораторных мышей линии C57BL/6был воспроизведен дефектагрегации β-амилоидных белков в головном мозге с последующей отмиранием нейронов и мутацию в генах APP, PSN-1 и PSN-2. Получили модифицированный нанотубулярный галлуазит.

Нейропротекторное действие нанокристаллов галлуазита на нейроны обусловлено связыванием свободных радикалов кислорода и антиоксидантным действием. Мы исследовали нанокристаллы галлуазита на возможность антиоксидантного воздействия и влияния восстановления нейронов в лечении нейродегенеративных заболеваний в эксперименте у лабораторных животных. Были впервые выявлены биологические свойства и молекулярные механизмы влияния нанокристаллов галлуазита на регулирование когнитивных процессов, восстановление пространственной памяти в головном мозге и восстановлении процессов синтеза белков, амилоидогенез.

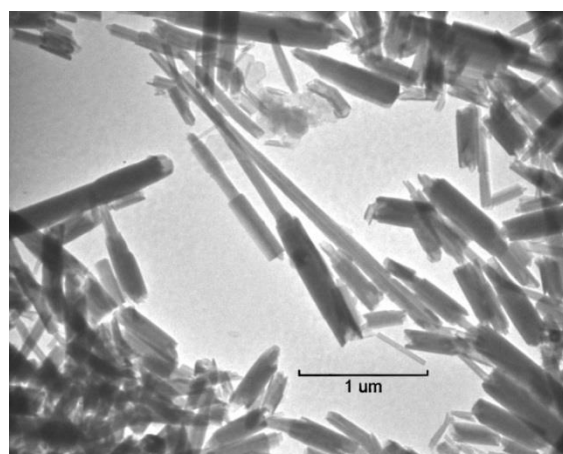
Известно, что нанокристаллы галлуазита обладают уникальной пространственной и электронной структурой, обуславливающей выраженные донорно-акцепторные, биологические и фотофизические свойства.

Галлуазит является одним из распространенных глинистых минералов (рис. 1). Формула галлуазита $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \cdot x nH_2O$, где $n=0$ и 2, однако хи-

мический состав минерала может незначительно варьировать. Структура и химический состав галлуазита близки к каолиниту, дикиту или накриту, однако алюмосиликатные слои в галлуазите разделены молекулами воды, что и является главным отличием. Прослойка воды в галлуазите является слабо связанной и дает расстояние около 10 Å между слоями, при дегидратации галлуазита мы получаем его форму 7 Å, которая очень близка к каолиниту, как сообщалось ранее [1]. Любая форма галлуазита (гидратированная или дегидратированная) имеют большую склонность к интеркаляции органических молекул. Частицы галлуазита могут принимать различные формы, самой распространенной из которых является удлиненная трубочка (рис. 1, а). Доминирующая форма галлуазита трубчатая. Другая форма сферический галлуазит с диаметром шариков в диапазоне от 0,05 до ~0,50 мкм. Псевдосферические или сферические частицы часто встречаются в вулканическом пепле и пемзе [2].



а



б

Рис. 1. Нанокристаллический галлуазит: а – измельченный порошок галлуазита до модификации (общий вид); б – нанокристаллы галлуазита после выделения и модификации (трансмиссионная электронная микроскопия)

В исследованиях использовались черные лабораторные мыши C57BL/6 20 – месячного возраста в

количестве 60 животных у которых предварительно в возрасте 3 месяца был воспроизведен дефект агрегации β -амилоидных белков в головном мозге с последующей отмиранием нейронов. Животные были разделены на опытную и контрольную группы. У мышей наблюдались приступы с потерей сознания, потеря чувствительности, отмирание нейронов, повышенная возбудимость, нейропатия. Мышам линии C57BL/6v хвостовую вену два раза в сутки вводились нанокристаллы галлуазита предварительно модифицированные монтмориллонитом. Концентрация раствора наночастиц составляла 0,1 %. Длина нанотрубок не превышала 500 нм. В данной работе были проведены исследования на изменения амилоидов после применения нанокристаллов галлуазита с помощью флуоресцентного детектирования и конфокальной микроскопии для анализа изменения амилоидных белков в головном мозге мышей.

Проводили *флуоресцентное* детектирование *амилоидных* агрегатов. Фибриллы получали из гиппокампа, гемоглобина и рибонуклеазы путем инкубации белков при денатурирующих условиях (глициновый буфер, pH=2.0, 60 °C) в течение двух недель. Окрашивание проводили с помощью классического амилоидного маркера Тиофлавина Т (ThT). Методом флуоресцентной микроскопии были обнаружены надфибрилярные агрегаты одиночные фибриллы этих белков. Эти агрегаты являются, предположительно, скоплениями амилоидных фибрилл, которые образуются в процессе их «старения» (рис. 2).

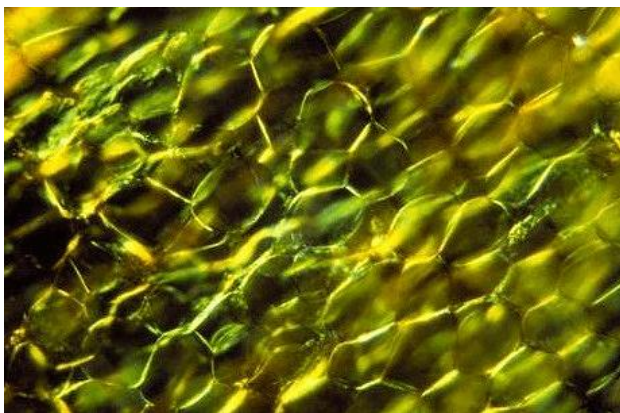


Рис. 2. Амилоидные отложения по периферии клеток гиппокампа головного мозга мышей, наблюдаемые по двойному лучепреломлению при окрашивании красителем конго красным

Далее проводили конфокальную микроскопию. Анализ агрегации и локализации белков, слитых с синим флуоресцентным белком CFP и желтым флуоресцирующим белком YFP, проводили при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 “Leica Microsystems GmbH” (Германия) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 MP “Leica Microsystems GmbH” (Германия). Условия: для CFP – возбуждающий лазер 458 нм, запирающий фильтр 462–510 нм, для YFP – возбуждающий лазер 514 нм, запирающий

фильтр 518–580 нм, для DAPI – возбуждающий лазер 405 нм, запирающий фильтр 425–475 нм. Микроскопию проводили на вторые сутки получения материала. Для приготовления микропрепаратов клетки гиппокампа суспендировали в стерильной воде и равномерно распределяли по поверхности предметных стекол “Polylysineslides” (“Gerhard Menzel GmbH”, Германия). После высыхания воды, препараты закладывали в среду “VECTASHIELD Mounting Media” (“Vector Laboratories”, США) или “VECTASHIELD Mounting Mediawith DAPI” (“Vector Laboratories”, США) для окраски красителем DAPI, и накрывали покровными стеклами.

Для расчета частоты агрегации количество клеток, в которых выявлялись агрегаты, делилось на общее количество клеток, в которых выявлялся сигнал флуоресцентного белка. Для определения частоты локализации агрегатов выбирались клетки, в которых присутствовали сигналы обоих исследуемых белков, и определялось количество клеток, в которых локализация этих сигналов совпадает. В 1-й, 3-й, 7-й и 15-й дни исследования проводили отбор крови из хвостовой вены на определение концентрации 8,12 – изопростана (IPF2A) иммуноферментативным методом в плазме крови, что является важным биомаркером продуктом перекисного окисления жирных кислот и пропорционально связан с уровнем $A\beta$ (рис. 6). Параллельно мы использовали тесты на сообразительность и поиск выхода из лабиринта, пытаясь понять улучшил ли галлуазит память и повлиял ли он на число бляшек в нейронах гиппокампа, на восстановление когнитивных функций.

5. Результаты исследования и их обсуждения

С помощью методов флуоресцентного детектирования и конфокальной микроскопии было установлено, что процент жизнеспособных клеток составлял 98 % после применения нанокристаллов. При исследовании фармакокинетики нанокристаллов галлуазита было установлено, что после подкожного введения мышам в дозе 5 нг/г массы тела быстро нарастала его концентрация в крови и параллельно в ликворе головного мозга, что говорит о его свободном прохождении через гематоэнцефалический барьер. У взрослых животных он повышал количество митозов нейронов в субвентрикулярной зоне и ольфакторных трактах, регулируя текущий нейрогенез особым гуморальным способом. Таким образом, нанокристаллы галлуазита осуществляют сложную регуляцию генерации *de novo* клеток мозга. Было установлено уменьшение амилоидных агрегатов с 98,9 % до 2 % (рис. 3). Нанокристаллы галлуазита проникают в клетку и ее цитоплазму, куда проникают непосредственно через клеточную мембрану, не повреждая ее. При этом вещество не проявляет специфичности к органеллам нейральных прогениторов. Нанокристаллы полностью метаболизируются в клетках до воды и молекулярного кислорода.

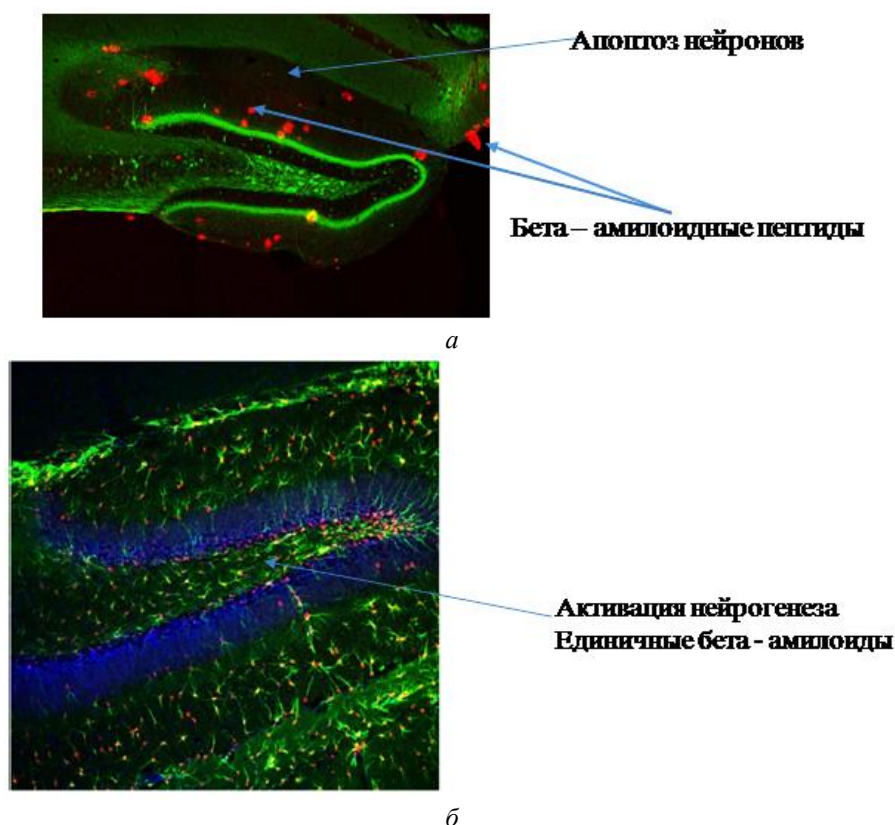


Рис. 3. Конфокальная микроскопия анализа влияния нанокристаллов на восстановление нейропротекторного эффекта: *a* – амилоидные образования (красный цвет); *б* – рассасывание амилоидных образований и нейрогенез нейронов (конфокальная сканирующая микроскопия)

Большое количество клеток с отсутствием локализации сигнала говорит об отмирании нейронов, нарушении метаболизма клеток, апоптозе клеток и нарушении нейронной проводимости клеток гиппокампа. Нарушение кальциевого транспорта и накопление кислород – содержащих радикалов инициирует апоптоз и некроз нейронов гиппокампа и головного мозга. Именно

поэтому мы стали изучать возможность влияния в первую очередь на биохимическую коррекцию системы кальциевого транспорта и снижением воздействия свободных радикалов на нейроны. Этим требованиям отвечает нанокристаллический галлуазит модифицированный монтмориллонитом, обладающий возможностью поглощать свободные формы кислорода (рис. 4).

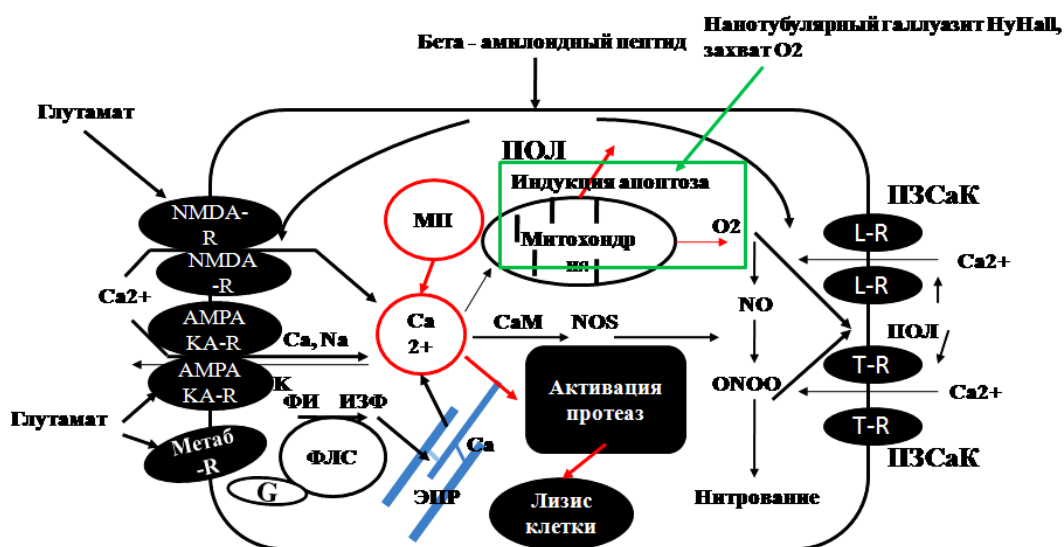


Рис. 4. Взаимосвязь процессов кальциевого транспорта и формирования кислород-содержащих радикальных метаболитов (OSRM) с основными процессами, инициирующими апоптоз клеток и влияние нанотубулярного галлуазита на захват свободного кислорода и ингибирование апоптоза

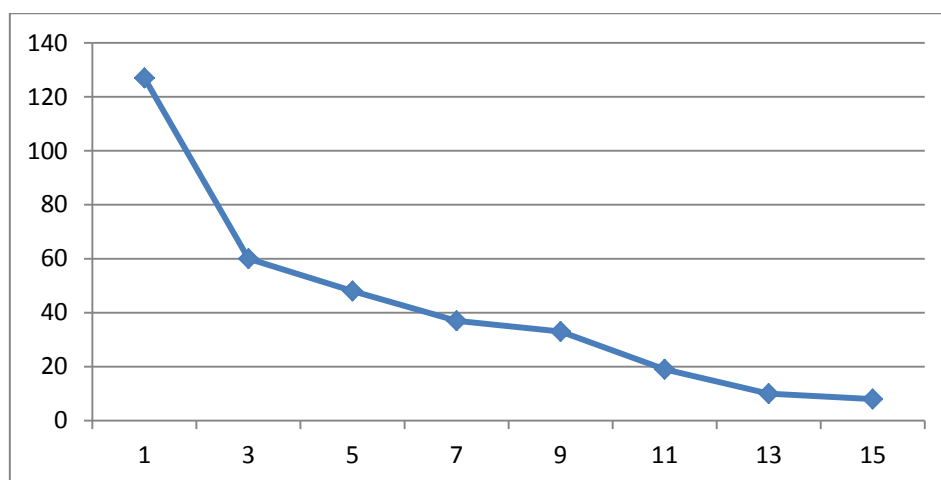


Рис. 5. Динамика содержания амилоидных белков (%) в гиппокампе мышей 20-месячного возраста при действии нанокристаллов галлуазита в период проведения исследования

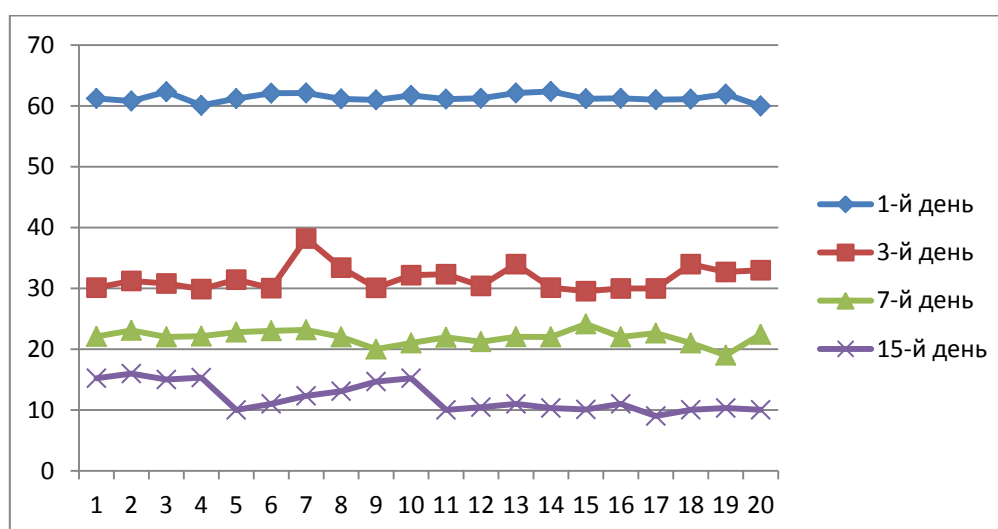


Рис. 6. Динамика уровня 8 – изопростана в плазме крови мышей опытной группы в период проведения исследования (зависимость концентрации изопростана pg/ml и продолжительности исследования)

Появление наногаллуазита в мозге действительно улучшило память грызунов и очистило их гиппокамп от обрывков бета – амилоидов. Первые положительные эффекты нами были замечены на первый день после введения мышам наногаллуазита. В среднем, через 3 дня концентрация бета – амилоидов в крови животных снизилась из 127 % до 60 %, через 7 дней до 37 %, через 15 дней наблюдались следы бета – амилоида (рис. 5). Мы полагаем, что галлуазит стимулирует выработку пептида – фермента неприлизина, который участвует в лизисе обрывков неправильно собранных пептидов, в том числе и бляшек из остатков белка APP.

Наногаллуазит сокращает количество и в то же время удваивает количество вновь образованных нейронов в зоне гиппокампа. Было показано снижение воспаления и окислительного стресса гиппокампа мозга, сопровождающее заболевание.

6. Выводы

Результатами исследования стали следующие данные подтверждающие нейропротекторное дей-

ствие нанокристаллов галлуазита на нейроны гиппокампа мышей по уменьшению амилоидных белков.

1. Были получены данные анализа изменения амилоидных агрегатов после применения нанокристаллов галлуазита.

2. Доказано уменьшение синтеза амилоидных белков и их разрушение.

3. Восстанавливается структура нейронов.

4. Показано, что в условиях *in vivo* количество нейронов при введении водорастворимые нанокристаллы галлуазита в концентрации 20 нм увеличивается почти в 2 раза по сравнению с контролем. При этом сохраняется их пролиферативная активность в течении всего периода исследования.

5. Уменьшается образование нейросфер.

6. Конфокальный ультраструктурный анализ показал, что нанокристаллы галлуазита проникают в клетку через клеточную мембрану, не повреждая ее, и локализуется в цитоплазме клетки. Это позволяет использовать нанокристаллы в биотехнологии и генной терапии таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и эпилепсии.

Литература

1. Рязанцева, М. А. Патогенез болезни Альцгеймера и кальциевый гомеостаз. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма. Т. 2 [Текст] / М. А. Рязанцева, Г. Н. Можаяева, Е. В. Казначеева; ред. М. В. Угрюмов. – М.: Наука, 2014. – С. 163–181.
2. Татарникова, О. Г. Бета-амилоиды и тау-протеины: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства [Текст] / О. Г. Татарникова, М. О. Орлов, Н. В. Бобкова // Успехи биологической химии. – 2015. – № 55. – С. 351–390.
3. Abdullayev, E. Enlargement of Halloysite Clay Nanotube Lumen by Selective Etching of Aluminum Oxide [Text] / E. Abdullayev, A. Joshi, W. Wei, Y. Zhao, Y. Lvov // ACS Nano. – 2012. – Vol. 6, Issue 8. – P. 7216–7226. doi: 10.1021/nm302328x
4. Abdullayev, E. Natural Tubule Clay Template Synthesis of Silver Nanorods for Antibacterial Composite Coating [Text] / E. Abdullayev, K. Sakakibara, K. Okamoto, W. Wei, K. Ariga, Y. Lvov // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2011. – Vol. 3, Issue 10. – P. 4040–4046. doi: 10.1021/am200896d
5. Bates, T. F. Morphology and structure of endellite and halloysite [Text] / T. F. Bates, F. A. Hildebrand, A. Swineford // American Mineralogist. – 1950. – Vol. 35. – P. 463–484.
6. Cavallaro, G. Exploiting the Colloidal Stability and Solubilization Ability of Clay Nanotubes/Ionic Surfactant Hybrid Nanomaterials [Text] / G. Cavallaro, G. Lazzara, S. Milioto // The Journal of Physical Chemistry C. – 2012. – Vol. 116, Issue 41. – P. 21932–21938. doi: 10.1021/jp307961q
7. Wang, L. Halloysite-Nanotube-Supported Ru Nanoparticles for Ammonia Catalytic Decomposition to Produce CO_x-Free Hydrogen [Text] / L. Wang, J. Chen, L. Ge, Z. Zhu, V. Rudolph // Energy & Fuels. – 2011. – Vol. 25, Issue 8. – P. 3408–3416. doi: 10.1021/ef200719v
8. Stefani, M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world [Text] / M. Stefani // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. – 2004. – Vol. 1739, Issue 1. – P. 5–25. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.08.004
9. Liu, M. Halloysite nanotubes as a novel β -nucleating agent for isotactic polypropylene [Text] / M. Liu, B. Guo, M. Du, F. Chen, D. Jia // Polymer. – 2009. – Vol. 50, Issue 13. – P. 3022–3030. doi: 10.1016/j.polymer.2009.04.052
10. Rawtani, D. Multifarious applications of halloysite nanotubes: a review [Text] / D. Rawtani, Y. K. Agrawal // Reviews on advanced materials science. – 2012. – Vol. 30. – P. 282–295.
11. Yuan, P. Properties and applications of halloysite nanotubes: recent research advances and future prospects [Text] / P. Yuan, D. Tan, F. Annabi-Bergaya // Applied Clay Science. – 2015. – Vol. 112–113. – P. 75–93. doi: 10.1016/j.clay.2015.05.001

*Рекомендовано до публікації д-р біол. Наук Гончаренко М. С.
Дата надходження рукопису: 21.07.2017*

Буряченко Семен Васильевич, аспирант, Отдел вирусных болезней птиц, ННЦ Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, ул. Пушкинская, 83, г. Харьков, Украина, 61023
E-mail: semenb837@gmail.com