

ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ Է  
ԵՊԲՀ ԳԻՏԱԿՈՈՐԴԻՆԱՑԻՈՆ  
ԽՈՐՀՐԴԻ ՆԻՍՏՈՒՄ  
ՆԱԽԱԳԱՀ՝ Կ.Գ.Դ., ՊՐՈՖԵՍՈՐ

Կ.Բ. ԵՆԿՈՑԱՆ

Արձանագրություն N \_\_\_\_\_ “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2018թ.

Կենսաբանական գիտությունների թեկնացու, թեկնածուի գիտական աստիճանի  
հայցման ատենախոսության

## Պ Լ Ա Ն - Ա Ն Ո Տ Ա Ց Ի Ա

Ասպիրանտ-

Մարգարիտա Լենիկի Միրումյան  
ԵՊԲՀ կենսաքիմիայի ամբիոնի ասպիրանտ

Թեզի վերնագիրը -

TLR4-ով միթնորդավորված իմունային պատասխանի  
դերը՝ աուտիստիկ սպեկտեկորի խանգարումների  
պրոպիոնաթթվով մակաձված մոդելում

Գիտական ղեկավար

Կոնստանտին Բորիսի Ենկոյան  
Կ. Գ. Դ., պրոֆեսոր, ԵՊԲՀ գիտության զծով  
պրոռեկտոր

Մասնագիտական դասիչը

Գ.00.04. «Կենսաքիմիա»

2018թ.

# 1. АКТУАЛЬНОСТЬ

## ВВЕДЕНИЕ

Расстройство аутистического спектра (РАС) - общее расстройство развития, характеризующееся стойким дефицитом способности начинать и поддерживать социальное взаимодействие и общественные связи, а также ограниченными интересами и часто повторяющимися поведенческими действиями. В расстройство аутистического спектра входят: синдром Аспергера, высокофункциональный аутизм, аутизм-савант, синдром Каннера, атипичный аутизм, синдром Ретта [1].

Новейшие исследования однозначно показали влияние продуктов метаболизма микробиоты кишечника на работу желудочно-кишечного тракта, на эндокринную, нервную и иммунную системы [2] [3]. В патогенезе расстройств аутистического спектра большую роль играют семейства таких бактерий как: Clostridial, Desulfovibrio и Bacteroidetes, продуктами метаболизма которых являются короткоцепочечные жирные кислоты (пропионовая кислота, масляная кислота и уксусная кислота).

Проведён ряд исследований с моделированием расстройств аутистического спектра, в которых выявлено опосредованное действие короткоцепочечных жирных кислот (в частности, пропионовой кислоты), способствующих повышению окислительного стресса [4] [5], с последующей активацией иммунной системы.

Одним из путей активации врожденного иммунитета является активация рецептора TLR4 (Toll-like receptor), который узнаёт и связывает липополисахариды (ЛПС) клеточной стенки патогенных грамотрицательных бактерий, инициируя иммунный ответ [6] [7]. Сигнал, передающийся в клетку через этот рецептор, является одним из древнейших в системе антибактериальной защиты организма. Основываясь на ключевой роли, которую врожденные иммунные клетки играют в иницировании и управлении иммунного ответа, первичная дисфункция врожденного иммунитета может объяснить распространенные иммунологические аномалии при РАС. При первичном иммунном ответе на новый патоген преобладают врожденные иммунные ответы и адаптивный иммунитет. Главными звеньями этой цепи являются моноциты, которые дифференцируются в макрофаги в тканях, фагоцитируют патогены и представляют антигены Т-клеткам, которые, в свою очередь, могут стимулировать продуцирование антител В-клетками. В отличие от адаптивных ответов, опосредуемых клетками Т и В, врожденные ответы на моноциты бывают быстрыми, но не являются антигенспецифичными и вместо этого осуществляются благодаря узнаванию ими высококонсервативных мотивов, общих для микроорганизмов, называемых «PAMPs» (патоген-ассоциированные молекулярные структуры), которые служат лигандами для (TLR) [8]. Узнавание PAMP специфическими TLR рецепторами на моноцитах приводит к продуцированию и высвобождению провоспалительных цитокинов,

включая интерлейкин 1-бета (IL-1 $\beta$ ), IL-6 и фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ). При этом показано, что цитокины, продуцируемые микроглией или моноцитами, могут влиять на нейронную функцию и нейрогенез и в конечном итоге - на поведение. Сигналы, генерируемые через различные типы TLR путем распознавания отдельных PAMPs, выраженных конкретными бактериями или вирусами, могут приводить к дифференциальной врожденной иммунной активности при PASC.

Однако, вовлеченность врожденной иммунной системы в патогенез расстройств аутистического спектра очень мало изучена.

В немногочисленных исследованиях этого процесса показаны нарушения иммунной функции, при этом выявлено наличие реактивных антител к определенным тканям мозга; искажение T-клеточных ответов на митогены; изменение уровней цитокинов в головном мозге, в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и периферии; а также изменение функции иммунных клеток, таких как моноциты и NK-клетки, ответственных за врожденный иммунитет [9] [10] [11].

Дэнни и др. показали значительное увеличение количества моноцитов у детей с ASD по сравнению со здоровыми детьми [12] [13]. Сообщалось о повышении уровней IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , TNFR1 и TNFR2, MCP-1 и MIP-1 $\beta$  в ЦСЖ и мозговых тканях, в ответ на активацию врожденного иммунного ответа. Кроме того, в образцах головного мозга у пациентов с ASD выявлены выраженная активация микроглии и астроцитов, повышение регуляции HLA-DR и увеличение уровней провоспалительных цитокинов, что обуславливало значительное нейровоспаление [14]. Недавние исследования транскрипции генов в посмертных образцах человеческого мозга показало, что несколько путей, связанных с врожденной иммунной функцией и его активацией, включая NF- $\kappa$ B, MAP-киназу, MET, каспазы, TOLL и цитокины (IL-1R, IL-6, TNFR2) были затронуты в большей степени в мозговой ткани пациентов с PASC по сравнению с контролем [15].

Критическими регуляторами иммунных реакций на периферии и в ЦНС могут быть дисфункции в линиях клеток моноцитов, играющие ключевую роль в генерации иммунных аномалий, наблюдаемых при ASD, включая потенциальные аутоиммунные реакции [15] [16]. Поскольку фенотип микроглии в тканях мозга у пациентов с PASC очень похож на активированные моноциты / макрофаги [17], исследование ответов моноцитов *in vitro* после стимуляции может способствовать пониманию механизмов, лежащих в основе измененных врожденных иммунных реакций в мозге пациентов с PASC. С этой целью была исследована реакция культур моноцитов на соответствующие природные патогены. Проводилась стимуляция моноцитов хорошо охарактеризованными лигандами для TLR 2, TLR 4, TLR 5 и TLR 9, чтобы определить, существуют ли дифференциальные ответы на эти лиганды при PASC [18].

Культуры клеток моноцитов у детей с ASD реагировали на стимуляцию ЛПС значительным увеличением концентрации IL-1 $\beta$  по сравнению с контролем, наблюдалось почти двукратное увеличение ответов IL-1 $\beta$  после стимуляции TLR 4 ЛПС. Однако концентрация хемокина MCP-1 значительно снижалась. Подобная реакция ассоциировалась с ослаблением социальной интеграции и невербальным общением.

Эти результаты согласуются с предыдущими сообщениями об усиленной врожденной иммунной активности при ASD [19], а также указывает на то, что у многих пациентов с ASD может возникнуть нефункциональный врожденный иммунный ответ (аутоиммунные реакции).

Провоспалительные цитокины, IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$ , которые преимущественно получены из клеток линии моноцитов, представляют особый интерес для изучения нейроиммунологического вклада в психиатрические расстройства. Эти цитокины могут действовать как локально, так и централизованно, что увеличивает нейровоспалительные реакции и / или влияет на функцию мозга (например, на индукцию серотонина из гипоталамуса), что может отражаться на поведении [20].

Актуальность данной работы заключается в исследовании TLR4 опосредованного иммунного ответа, индуцированного пропионовой кислотой. В работе будет также детализирована роль микроглии и астроцитов в процессе нейродегенерации. Хотя исследования на животных моделях имеют ряд недостатков при понимании аспектов РАС у пациентов, они могут отражать или давать подсказки относительно того, как иммунные опосредованные ответы могут привести к ранним изменениям в мозге и изменениям в поведении у пациентов.

## НАУЧНАЯ НОВИЗНА

### 1.2 КРИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

*Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y. & 20 other authors (2012). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. Clin Infect Dis 35 (Suppl. 1), S6–S16.*

*Bolte, E. R. (1998). Autism and Clostridium tetani. Med Hypotheses 51,133–144.*

Проведены исследования на выявление связи между гастроэнтерологическими дисфункциями и развитием РАС у детей. В экспериментах участвовали 58 детей (в возрасте до 16-ти лет) с РАС и 24 здоровых детей (контрольная группа). Для подтверждения влияния метаболитов микробиоты на поведение пациентов контрольной группы исследовался бактериальный состав кала. Детям с РАС назначали курс антибиотиков, после которого наблюдалось улучшение в их поведении. Но после

прекращения курса приема лекарств споры патогенных микробов (*Clostridium tetani*, *Bacteroides fragilis* и т.д.), оставшиеся в кишечнике, способствовали восстановлению патогенной микробиоты, что приводило к ухудшению состояния и поведения детей.

Однако исследования группы *Helena M. R. T. Parracho, Max O. Bingham,† Glenn R. Gibson and Anne L. McCartney*. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology* (2005), 54, 987–991 оказались несколько противоречивыми. В данной серии экспериментов были изучены данные трёх групп: первая группа - дети с РАС, вторая - их здоровые братья и/или сестра, третья группа здоровые дети, не имеющие генетической связи с больными РАС. Авторы показали абсолютно разный состав микрофлоры исследуемого кала у детей с РАС и у детей третьей группы. Но исследования кала детей с РАС и их здоровых братьев и сестёр показали у них наличие одинаковой патогенной микрофлоры. Что указывает на наличие иных факторов (например, различия проницаемости стенок кишечника, иммунной системы, нейрогенеза и др., обусловленные генетически и/или приобретённые в процессе пренатального развития)

*Sandy R. Shultz and Derrick F. MacFabe* . Propionic Acid Animal Model of Autism (2014).

Пропионовая кислота еще не изучена непосредственно у пациентов с РАС, поэтому интра цереброваскулярное введение пропионовой кислоты в модели РАС у грызунов индуцирует нарушения в социальном поведении, аномальные движения, повторяющиеся интересы и когнитивный дефицит, судорожное поведение. Мозговая ткань у подопытных крыс показывает ряд нейрохимических изменений, таких как нейровоспаление, увеличение окислительного стресса, истощение глутатиона и изменение фосфолипид ацилкарнитинового профиля, что согласуется с результатами постмортального анализа мозговой ткани пациентов с РАС.

Врачи, лечащие детей с высоким уровнем пропионата в крови (пропионатацидемия) обусловленным генетическими факторами, а также детей с генетически обусловленными нарушениями в цикле мочевины, редко выявляют у них признаки РАС. *Bell JG, MacKinlay EE, Dick JR, et al*. Essential fatty acids and phospholipase A2 in autistic Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004;71:201–4. *Bergersen L, Rafiki A, Ottersen OP*. Immunogold cytochemistry identifies specialized membrane domains for monocarboxylate transport in the central nervous system. *Neurochem Res*. 2002;27:89–96.

Данные этих авторов могут указывать на то, что наличие высокого уровня пропионата в крови не может однозначно способствовать развитию РАС.

### 1.3 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *American Psychiatric Association*. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5). — Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013. — 992 p
- [2]. Jacquemin J, Ammiraju JS, Haberer G, et al. : Fifteen million years of evolution in the *Oryza* genus shows extensive gene family expansion. *Mol Plant* 2014;7:642–656
- [3]. Surjyadipta B, Lukiw WJ, Alzheimer's disease and the microbiome. *Front Cell Neurosci* 2013;7:153–160
- [4] Petrof EO, Claud EC, Gloor GB, Allen-Vercoe E. Microbial ecosystems therapeutics: a new paradigm in medicine. *Benef Microbes* 2013; 4:53-65
- [5] Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010
- [6] Vaure C, Liu Y (2014-07-10). "A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species". *Frontiers in Immunology*. **5**: p316.
- [7] Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC (2015). "*Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective*". *Annual Review of Immunology*. **33**: p257–90.
- [8] Fleer A, Krediet TG. Innate immunity: toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn. *Neonatology*. 2007;92:145–157.
- [9] Ashwood P, Schauer J, Pessah IN, Van de Water J. Preliminary evidence of the in vitro effects of BDE-47 on innate immune responses in children with autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol*. 2009;208:130–135.
- [10] Ashwood P, Wakefield AJ. Immune activation of peripheral blood and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J Neuroimmunol*. 2006;173:126–134.
- [11] Denney DR, Frei BW, Gaffney GR. Lymphocyte subsets and interleukin-2 receptors in autistic children. *J Autism Dev Disord*. 1996;26:87–97.
- [12] Sweeten TL, Posey DJ, McDougale CJ. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *Am J Psychiatry*. 2003;160:1691–1693.
- [13] Vargas DL, Nascimbene C, Knshnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005;57:67–81.

- [14] Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, Persico AM. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis.* 2008;30:303–311.
- [15] Cabanlit M, Wills S, Goines P, Ashwood P, Van de Water J. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1107:92–103.
- [16] Wills S, Cabanlit M, Bennett J, Ashwood P, Amaral DG, Van de Water J. Detection of autoantibodies to neural cells of the cerebellum in the plasma of subjects with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* 2009;23:64–74.
- [17] Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol.* 2004;186:134–144.
- [18] Amanda M Enstrom, Charity E Onore, Judy A Van de Water, and Paul Ashwood. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* 2010 Jan; 24(1): 64–71).
- [19] Croonenberghs J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M. Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology.* 2002;45:1–6
- [20] Dunn AJ. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res.* 2006;6:52–68.
- [21] MacFabe DF, Rodriguez-Capote K, Hoffman JE, Franklin AE, Mohammad-Asef Y, Taylor A, et al. A novel rodent model of autism: intraventricular infusions of propionic acid increase locomotor activity and induce neuroinflammation and oxidative stress in discrete regions of adult rat brain. *Am J Biochem & Biotech.* 2008;4:p146–66.
- [22] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 2nd ed. New York: Academic Press; 1986.

## 2. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имеются ряд работ, моделирования расстройств аутистического спектра (РАС) опосредованное действием короткоцепочечных жирных кислот (пропионовая кислота, масляная кислота и уксусная кислота), которые повышают окислительный стресс[21].

Целью работы является выявление вовлеченности TLR4 опосредованного вырожденного иммунного ответа при экспериментальном моделировании РАС вызванный внутрижелудочковой инъекцией пропионовой кислоты.

Для решения поставленной цели будут выполняться следующие задачи:

1. показать релевантность внутрижелудочковой инъекции пропионовой кислоты в качестве модели для PAC
  - а) с помощью батареи поведенческих тестов (Х лабиринт, Y лабиринт, открытое поле, узнавание нового объекта, болевая чувствительность (Hot plate), акустический тест).
  - б) выявление морфологических изменений в различных структурах головного мозга.
2. показать вовлеченность TLR4 путей в клетках микроглии
  - а) выделить микроглиальные клетки головного мозга
  - б) показать спайковую активность нейронов мозжечка, амигдалы
  - в) в выделенных клетках определить:
    - количество белка (рецептор TLR4) методом Вестерн блот
    - уровень экспрессия гена белка (рецептор TLR4) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
    - количество белков: каспазы 1, NF-κB и IκB методом Вестерн блот и IL-1 и IL-18 методом иммуноферментного анализа (ELISA).

### **3. ВИД ИССЛЕДОВАНИЯ**

экспериментальный

### **4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **4.1 ЖИВОТНЫЕ И УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ**

В общей сложности для моделирования данной проблемы будет использовано 60 взрослых (приблизительно 70-ти дневных) самцов. Животные в течении этого периода будут содержаться в клетках (360 x 245 x 105 мм) при контролируемой температуре (21 ± 1) °C со свободным доступом к пище и воде, при освещенности помещения от 20 до 30 lux. Все поведенческие испытания, будут производиться с учётом циркадных ритмов животных (от 09:00 до 19:00 ч).

#### **4.2 ХИРУРГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ**

Животным, с использованием стандартных стерилитических методов, будет имплантирована направляющая канюля 23-го калибра. Канюля будет имплантирована в латеральный желудочек мозга (AP 1,3 мм, 1,8 мм ML; 2.0 мм DL [22]) внутренняя (направляющая) часть канюли 23-го калибра, длиной 5мм, выступающая часть 30-го калибра фиксируется на черепной коробке винтами и зубным акрилом. Эксперименты над животными проводятся на 15-ый день после хирургических операций.

#### **4.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ГРУППЫ**



Животные будут разделены на две группы: контрольную, которым будем вводить физраствор (NaCl 0.9% раствора) и опотную группу, которым будет введён пропионовая кислота (4.0мкл 0.052М раствора). Ежедневно по два раза: в 9:00 и в 15:00 перед проведением поведенческих тестов.

#### **4.4. ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ТЕСТЫ**

С целью оценивания чувства тревожности нами планируется использовать тест Х лабиринт с продолжительностью 5 минут. Для выявления степени тревожности определяется соотношение времени проведённого в открытых и закрытых рукавах.

С целью оценивания пространственной памяти используем Y лабиринт с продолжительностью 5 минут. Для оценивания пространственной памяти определяется спонтанное чередование рукавов.

С целью оценки памяти животного используется тест узнавания нового объекта. При этом вычисляется соотношение времени проведенного за исследованием нового и старого объекта.

С целью оценки чувства боли используется тест горячей платформы. Фиксируется время, когда животное отдергивает заднюю лапу от горячей платформы при температуре 50°C.

С целью оценивания «социальной» коммуникации регистрируются ультразвуковые волны, излучаемые животными.

#### **4.5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для количественного определения белков нами планируется использовать метод иммуноблотинга и иммуноферментного анализа. Определения будут проводиться в тканевых гомогенатах, полученных из разных структур головного мозга. На первой стадии иммуноблотинга будет произведено разделение белков методом электрофореза на полиакриламидном геле, с дальнейшим трансфером белков на нитроцеллюлозную мембрану. Иммуноблотинг исследуемых белков будет достигнут инкубацией мембраны в растворе разведенных первичных моноклональных антител с продолжительностью времени указанной в инструкции. После инкубации вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена, будет произведена детекция хемилюминесцентного сигнала с помощью геля документирующей системы Fusion FX. Для иммуноферментного анализа нами будут использованы коммерческие кит наборы с абсорбированными антителами на поверхности планшета. Колориметрическое измерение будет осуществлено на планшетном спектрофотометре Multiscan GO.

## 5. СООТВЕТСТВИЕ РАБОТЫ УТВЕРЖДЕННОЙ ТЕМЕ

Работа является инициативной и самостоятельной.

## 5. КАЛЕНДАРНЫЕ СРОКИ ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ:

1. Анализ источников литературы	2016 ноябрь
2. Овладение методиками	2017 февраль
3. Сбор материала	2017-2018
4. Публикация научных статей	2018-2020
5. Оформление диссертации	2019-2020
6. Предварительная экспертиза работы (апробация)	2019
7. Защита диссертационной работы	2020

Научный руководитель:

\_\_\_\_\_

подпись

Аспирант

\_\_\_\_\_

подпись

тел. раб., дом, сот. (010) 48 03 57, (055) 30 05 86

e-mail: [margaritamirumyan@gmail.com](mailto:margaritamirumyan@gmail.com)