

Изучение роли нейровоспаления и нейрональной аккумуляции железа в патогенезе болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера

Актуальность исследования

Болезнь Паркинсона (БП) и болезнь Альцгеймера (БА) - самые распространенные нейродегенеративные заболевания (НДЗ), сопровождающиеся нейрональной аккумуляцией железа в головном мозге, ассоциированные с гибелью нейронов головного мозга у лиц пожилого возраста. При БП и БА развиваются моторные и когнитивные нарушения, которые как правило приводят к инвалидизации. БП и БА на сегодняшний день неизлечимы, а существующая терапия не способна полностью остановить или существенно замедлить процесс гибели нейронов. В рамках планируемой НИР крайне актуальным является изучение уровня лактоферрина (ЛФ) в нейтрофилах периферической крови с одной стороны как потенциального биомаркера, а с другой как вещества, вероятно обладающего свойствами нейропротектора при БП и БА. Связь ЛФ с некоторыми НДЗ и нейровоспалением в настоящее время подтверждается работами отечественных и зарубежных ученых. Изучение уровня железа в нейронах мозга при различных НДЗ позволит выявить корреляцию с уровнем лактоферрина в нейтрофилах периферической крови, что является перспективным для использования данного биохимического показателя в качестве потенциального биомаркера БП и БА.

Научная платформа

Неврология

Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель: Андоскин Павел Александрович,
зав. НИО биохимических исследований ЦДТИ ИЭМ, к.б.н.

Исполнители:

Научно-исследовательский отдел биохимических исследований Центра доклинических трансляционных исследований Института экспериментальной медицины
Научно-исследовательская группа экспериментальной патоморфологии;
Виварий Института экспериментальной медицины.

Ключевые слова

неврология, Болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, нейровоспаление, аккумуляция железа, лактоферрин, медиаторы воспаления, нейропротекция.

Цель проекта

Разработка подходов к ранней диагностике и терапии нейродегенеративных заболеваний (болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера), основанных на взаимосвязи нейровоспаления и нейрональной аккумуляции железа в головном мозге.

Задачи проекта

В группе пациентов и в контрольной группе: 1) оценить уровень нейтрофилов в периферической крови; 2) оценить уровень лактоферрина в однородной фракции нейтрофилов при БП и БА; 3) определить уровень экспрессии гена лактоферрина (*LTF*) в нейтрофилах; 4) оценить уровни медиаторов воспаления цитокинового профиля, а так же относительный уровень мРНК ряда медиаторов воспаления в нейтрофилах (ИЛ-1, ИЛ-6,

ФНО-α и др.) 5) сопоставить клинические характеристики (тяжесть заболевания, возраст начала, продолжительность болезни и др.) у пациентов с БП и БА со всеми перечисленными биохимическими показателями.

В группе животных (крыс) с SPF-статусом с моделями БП и БА и в контрольной группе: 1) оценить поведенческие функции до и после введения лактоферрина; 2) оценить уровень нейтрофилов в периферической крови; 3) оценить уровень ЛФ в нейтрофилах периферической крови; 4) оценить уровни медиаторов воспаления цитокинового профиля, а так же относительный уровень мРНК ряда медиаторов воспаления в нейтрофилах (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α и др.); 5) измерить уровень аккумулированного нейронального железа, а также уровень ЛФ и уровень экспрессии *LTF* в гомогенате головного мозга после введения ЛФ. 6) определить эффективность действия лактоферрина при наличии неврологической симптоматики, а так же его нейропротекторные свойства.

Ожидаемые результаты проекта

Изучение в рамках данного исследования различных нозологий, таких как БП и БА, позволит понять, является ли выявленное ранее статистически значимое снижение уровня/активности секреторных белков нейтрофилов (в частности, ЛФ) в плазме специфичным для БА или данный сдвиг белкового гомеостаза обнаруживается при различных НДЗ. Таким образом, в результате планируемого исследования могут быть разработаны подходы к ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний, а также будут получены результаты, которые позволят использовать белок лактоферрин в качестве лекарственного препарата, позволяющего предотвращать процесс развития заболевания и/или замедлять процесс гибели нейронов, таким образом улучшая качество жизни пациентов с данными патологиями. Полученные данные могут найти применение в решении задачи ранней досимптоматической диагностики НДЗ, в частности БП и/или БА, а также лечь в основу создания информативных тест-систем.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике, а также в клинической лабораторной диагностике в качестве специфических биохимических маркеров НДЗ (в частности, болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера). В случае выявления возможности использования уровней секреторных белков нейтрофилов в качестве биохимических маркеров возможным будет разработать тест-системы для скрининга лиц, входящих в группы риска по развитию НДЗ или у пациентов с подозрением на неврологические расстройства с целью исключения или подтверждения диагноза. Важной характеристикой подобного рода биохимических маркеров является их предикторная способность, то есть возможность предсказать развитие заболевания за долго до проявления клинических симптомов, а, следовательно, это открывает перспективы для разработки препаратов с выраженным нейропротекторным действием на основе лактоферрина.

Описание предлагаемого научного исследования

Ключевым патогенетическим событием при БП и БА рассматривается накопление нейротоксичных белковых отложений в различных структурах мозга (альфа-синуклеина при БП, тау и бета-амилоида при БА), однако в настоящее время все больше внимания уделяется роли нейровоспаления, сопровождающегося существенным увеличением выработки провоспалительных цитокинов (в частности IL-1, IL-6, TNF, и др.), а также нейрональным накоплением железа при данных НДЗ.

В рамках планируемого исследования актуальным является изучение уровней лактоферрина (ЛФ) и медиаторов воспаления в нейтрофилах периферической крови,

которые могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров нейродегенерации. Большой интерес представляет исследование возможных терапевтических свойств ЛФ. ЛФ — секреторный белок нейтрофилов — клеток врожденного иммунного ответа, который был обнаружен в высоких концентрациях в нейронах головного мозга при БП и БА. Выявленное ранее снижение уровня и активности ЛФ в плазме крови на фоне повышения уровня провоспалительных цитокинов (IL-6) у пациентов с БА, подтверждает вероятную роль воспаления в патогенезе данного НДЗ. На основе данных, полученных в последние годы, можно сделать вывод, что нейтрофилы принимают участие в патогенезе не только инфекционных, но и хронических неинфекционных заболеваний, в том числе и заболеваний ЦНС.

Идея использования уровня ЛФ в нейтрофилах периферической крови для диагностики НДЗ ранее не обсуждалась. Причины показанного ранее снижения уровня и активности ЛФ в плазме крови коррелирующего с повышением уровня провоспалительного цитокина (ИЛ-6) в плазме крови у пациентов с БА требуют детального изучения. Важным представляется впервые оценить уровень лактоферрина в нейтрофилах при другом неврологическом расстройстве — БП. Это поможет выяснить, является ли снижение уровня ЛФ на фоне нейровоспалительного процесса специфическим для БА или общим для различных НДЗ. Наличие антиоксидантных и иммуномодулирующих свойств у ЛФ позволяет предположить возможность использования его как в качестве нейропротектора, так и в качестве терапевтического средства, способного уменьшать интенсивность окислительного стресса, тем самым уменьшая повреждающее действие активных форм кислорода, синтезирующихся в том числе по причине аккумуляции железа в нейронах мозга, а также ослабляя нейровоспаление и замедляя нейродегенерацию.

Проведение одного из фрагментов данного исследования планируется с использованием грызунов с SPF (specified pathogen free)-статусом. Использование данной группы животных, свободных от патогенной микрофлоры, ранее не производилось и является принципиально важным для оценки уровня нейрональной аккумуляции железа при БП и БА. Заявленная группа животных предположительно может более тонко отражать процесс накопления железа в мозге, так как изначально имеет пониженный физиологический уровень железа. Изучение уровня железа в нейронах мозга при различных НДЗ позволит выявить корреляцию с уровнем лактоферрина в нейтрофилах периферической крови, что является перспективным для использования данного биохимического показателя в качестве потенциального биомаркера БП и БА. Также актуальным является исследование изменений уровня нейронального железа на фоне введения ЛФ животным с целью изучения его потенциальных нейропротекторных и терапевтических свойств. Проект будет реализован с использованием биологического материала (периферической крови, плазмы периферической крови, фракции нейтрофилов, гомогенатов мозга (от крыс)), полученного от пациентов с БП, БА, и от лиц контрольной группы (без неврологических расстройств). Также в исследование войдут группы животных с моделями БП, БА и контрольная группа.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

В ходе исследования предполагается использование современных и высокоточных методов. Так оценка поведенческих и когнитивных функций у крыс будет произведена методами радиального лабиринта, Т-образного лабиринта, методом Скиннера и с помощью водного лабиринта Морриса. Создание моделей БП и БА у крыс будет осуществлено с помощью нейротоксинов. Исследование показателей периферической крови (в частности, нейтрофилов и др. показателей (клинический анализ крови)) будет произведено с использованием методов проточной цитометрии; уровень гемоглобина

будет определен с помощью метода SLS - гемоглобин; детекция эритроцитов и тромбоцитов будет произведена методом гидродинамического фокусирования.

Исследование уровня секреторных белков нейтрофилов (ЛФ), а также уровня медиаторов воспаления (провоспалительных цитокинов) будет произведено методом иммуноферментного и/или методом проточной цитофлуориметрии с использованием разработанных, и/или коммерческих тест-систем.

Измерение уровня мРНК медиаторов воспаления, а также *LTF* будет производиться методами обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени. Эффективность нейропротекторного действия ЛФ будет оценена на основании результатов когнитивных тестов у крыс с моделью БП и БА после его введения. Все полученные результаты будут подвержены статистической обработке.