

Горина Яна Валерьевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АССОЦИИИ
ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА
С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации (Красноярск)

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Салмина Алла Борисовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний" (Кемерово)

**Груздева
Ольга
Викторовна**

доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нормальной физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (Казань)

**Мухамедьяров
Марат
Александрович**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины" (Новосибирск)

**Тихонова
Мария
Александровна**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 20__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.01 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины" по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Пальчикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из ведущих неврологических заболеваний, диагностируемых у пожилых людей и являющимся наиболее частой формой деменции. По прогнозам ученых распространенность БА во всем мире составит от 84 миллионов к 2040 году до более 100 миллионов к 2050 году [Brookmeyer R., 2007; Prince M., 2013].

БА является многофакторным заболеванием, поскольку в ее патогенез вовлечены как генетические факторы, так и факторы окружающей среды. Небольшая часть случаев связана с мутацией генов, кодирующих белок-предшественник бета-амилоида (APP), пресенилин 1 и пресенилин 2, и характеризуется как семейная форма с ранним началом развития заболевания. Наиболее распространенной формой БА является спорадическая, в которой главными факторами риска выступают возраст и наличие в семейном анамнезе деменции [Пономарева Н.В., 2018; Dorszewska J., 2016; Stefanova N. A., 2016].

В настоящее время общепризнано, что патологическое изменение уровня инсулина / передачи его сигналов может оказывать выраженное негативное влияние на функции ЦНС, при этом было высказано предположение, согласно которому нарушения церебральной инсулин сигнализации (локальная инсулинорезистентность) и метаболизма глюкозы в головном мозге могут увеличивать риск развития БА [Булгакова С.В., 2020; Lyra e Silva N. de M., 2019].

Как известно, БА имеет несколько общих молекулярных и клеточных механизмов с сахарным диабетом 1-го, 2-го типа и инсулинорезистентностью, а именно, нарушение передачи сигналов инсулина в головном мозге, нейровоспаление, окислительный стресс, увеличение уровня рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE, нарушение механизма передачи сигналов гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3beta), дисметаболизм глюкозы [Caberlotto L., 2019]. Это дало основания назвать БА специфической для головного мозга формой «диабета 3-го типа» [Боголепова А.Н., 2015; Moreno-Gonzalez I., 2017].

Несмотря на то, что до настоящего времени было проведено значительное количество исследований по изучению клеточного и молекулярного механизмов развития БА, однако до сих пор остается ряд нерешенных вопросов, касающихся участия компонентов инсулин-сигнального пути в патогенезе заболевания. Поэтому понимание каскада патологических изменений, которые в конечном итоге предшествуют агрегации бета-амилоида 1-42 ($A\beta_{1-42}$) и гиперфосфорилированию тау-белка, является центральным для выявления новых факторов риска развития БА и определения приоритетных терапевтических целей, которые можно использовать для профилактических вмешательств.

Степень разработанности темы исследования

Церебральная метаболическая дисфункция является общепризнанной особенностью хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа, о чем свидетельствует развитие дисметаболизма глюкозы в головном мозге еще за несколько лет до проявления первых симптомов заболевания [Mosconi L., 2008].

Известно, что церебральная инсулинорезистентность представляет собой выраженное снижение чувствительности клеток головного мозга к инсулину [Pugazhenthí S., 2017]. На клеточном уровне последствия развития инсулинорезистентности могут проявляться в виде нарушения нейро- и синаптической пластичности, регуляции высвобождения нейротрансмиттеров в нейронах, а также поглощения глюкозы нейронами, экспрессирующими инсулинзависимый глюкозный транспортер GLUT4 [Чистякова О.В., 2019; Mielke J. G., 2005].

Существует ряд молекул, которые участвуют в передаче сигналов инсулина - фосфатидилинозитид-3 киназа (PI3K), протеинкиназа В (Akt-киназа), протеинкиназа С, GSK-3beta, киназы, регулируемые внеклеточными сигналами 1/2 (ERK1/2). Уменьшение чувствительности инсулина к его рецепторам вызывает нарушение регуляции этих молекул, что, в конечном итоге, активирует как гиперфосфорилирование тау-белка, так и отложение A β 1-42, двух основных патологических признаков нейродегенерации альцгеймеровского типа [Помыткин И.А., 2018; Hölscher C., 2020].

Показано присутствие препроинсулина-I и его мРНК в аксонах, синапсах и дендритах мозга крысы [Duarte A. I., 2012], что приводит к синтезу инсулина в нейронах головного мозга. Установлено, что рецепторы инсулина экспрессируются в различных типах клеток ЦНС (нейронах, астроцитах, эндотелии) [Zhang Y., 2016], и распределяются в определенных областях головного мозга (гипоталамус, гиппокамп, кора, миндалевидное тело и обонятельная луковица) [Marks J. L., 1990].

Эндотелиально-специфическая инактивация гена инсулинового рецептора *in vivo* приводит к значительному снижению передачи сигналов инсулина в гипоталамусе, гиппокампе и префронтальной коре головного мозга, увеличению проницаемости ГЭБ в обонятельной луковице, а также уменьшению уровня экспрессии белков плотных контактов в гипоталамусе, тем самым вызывая нарушение структурно-функциональной целостности ГЭБ [Konishi M., 2017].

Известно, что инсулин может регулировать кинетику A β 1-42 в плазме и головном мозге, а также его транспорт через эндотелий ГЭБ. При этом нарушение мозгового клиренса A β 1-42 через ГЭБ, опосредованное патологическим изменением уровня инсулина, способствует прогрессированию БА [Kulstad J. J., 2006].

Установлено, что при развитии БА наблюдаются патологические изменения в передаче сигналов по инсулиновому PI3K-Akt-пути – снижение уровня PI3K и Akt на фоне гиперэкспрессии GSK-3beta, что приводит к развитию астроглиоза, апоптоза и гиперфосфорилированию тау-белка. В то же время, нарушение экспрессии ключевых компонентов инсулин-сигнального MAPK-пути, в частности, c-Jun N-концевых киназ (JNK), p38- MAPK и ERK1/2, вызывает эксайтотоксичность, синаптическую дисфункцию, активацию β - и γ -секретаз, фосфорилирование APP и тау-белка [Rivera E. J., 2005].

Инсулин-сигнальный путь может способствовать транспортировке глюкозы в ЦНС за счет регулирования глюкозных транспортеров GLUT. Однако высокие уровни глюкозы ввиду снижения ее метаболизма могут приводить к осаждению A β 1-42, что приводит к образованию активных форм кислорода и снижению

выработки АТФ, тем самым способствуя развитию окислительного стресса и дисфункции митохондрий. Это может привести к нарушению производства клеточной энергии, а также снижению секреции и чувствительности инсулина [Tramutola A., 2020]. При этом наблюдается четкая взаимосвязь между нарушением инсулин-сигнализации, отложением А β 1-42 и митохондриальной дисфункцией.

Известно, что рецепторы инсулина распределены по всему головному мозгу, особенно в областях, связанных с познанием, таких как префронтальная кора и гиппокамп [Pomytkin I., 2018]. Инсулин-сигнализация способствует синаптогенезу и синаптическому ремоделированию как *in vivo* [Chen T.-J., 2014], так *in vitro* в культивируемых нейронах гиппокампа [Hori K., 2005]. Показано, что резистентность к инсулину ассоциирована со снижением нейрональной активности в лобных областях при БА, и имеет выраженную взаимосвязь с развитием и прогрессированием когнитивных нарушений [Su F., 2017].

Совокупность эпидемиологических, доклинических и клинических данных доказывает, что структурная и функциональная целостность ЦНС может быть нарушена в результате развития метаболических нарушений, в частности, нарушений инсулин-сигнальной трансдукции в головном мозге. Эти деструктивные изменения могут вносить существенный вклад в патогенез БА, и, наоборот, прогрессирование БА может служить пусковым механизмом развития инсулинорезистентности головного мозга, тем самым формируя порочный круг положительной обратной связи.

Необходимо отметить, что ввиду тесной взаимосвязи между метаболическими заболеваниями, церебральной инсулинорезистентностью, снижением когнитивных функций и БА, возникает необходимость в идентификации молекулярных маркеров, способных обнаруживать развитие локальной резистентности к инсулину до развития эффектов или даже в отсутствии периферической инсулинорезистентности, что, в свою очередь, может выступать в качестве детектора повреждений головного мозга из-за метаболических и нейродегенеративных нарушений.

Цель исследования

Изучить молекулярно-клеточные механизмы формирования локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга и ее последствия для клеток нейрональной и эндотелиальной природы, их роль в патогенезе нарушения нейропластичности и развития церебральной амилоидной ангиопатии при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Задачи исследования

1. Изучить особенности синтеза инсулина, экспрессии молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции и метаболизма глюкозы в нейронах и церебральной эндотелии при экспериментальной болезни Альцгеймера.

2. Изучить эффекты инсулина в нейронах гиппокампа и миндалевидного тела головного мозга в отношении механизмов нейропластичности и их нарушений при экспериментальной болезни Альцгеймера.

3. Исследовать патогенетические механизмы повреждения гематоэнцефалического барьера и особенности церебрального ангиогенеза при

нейродегенерации альцгеймеровского типа в условиях формирования локальной инсулинорезистентности

4. Оценить вклад белков RAGE в развитие нарушений церебрального ангиогенеза и проницаемости гематоэнцефалического барьера при экспериментальной болезни Альцгеймера в условиях формирования локальной инсулинорезистентности.

5. Разработать концепцию патогенеза нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с развитием локальной инсулинорезистентности, в ткани головного мозга.

Научная новизна

Впервые показано, что острое токсическое действие $A\beta$ 1-42 вызывает повышение экспрессии гена *insulin I* в миндалевидном теле головного мозга, сопряженное с нарушением в нейронах экспрессии молекул-компонентов инсулин-опосредованной внутриклеточной сигнальной трансдукции – инсулинового рецептора (IR), субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1), протеинкиназы C, гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3beta), митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) и инсулин-регулируемой аминопептидазы (IRAP), что указывает на роль $A\beta$ 1-42 в развитии инсулинорезистентности в миндалевидном теле головного мозга.

Хроническая аккумуляция $A\beta$ 1-42 (мыши линии 5xFAD) в нейронах миндалевидного тела головного мозга также вызывает нарушение экспрессии молекул-компонентов инсулин-сигнальной трансдукции – субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1), протеинкиназы C, гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3beta), митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) и инсулин-регулируемой аминопептидазы (IRAP). Указанные изменения ассоциированы с формированием тревожности и нарушением процесса запоминания. Это обосновывает гипотезу о роли бета-амилоид-индуцированной инсулинорезистентности в миндалевидном теле на реализацию когнитивных функций при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Впервые обнаружена разная чувствительность нейронов к инсулину в CA1 области гиппокампа и базо-латеральной зоне миндалевидного тела. В нейронах миндалевидного тела в условиях острого токсического действия $A\beta$ 1-42 влияние инсулина на синаптическую передачу полностью нивелируется, что проявляется в нарушении возбудимости нейронов в виде разнонаправленного изменения амплитуд полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП). Нарушение механизмов действия инсулина на синаптическую пластичность в гиппокампе и миндалевидном теле при аккумуляции бета-амилоида ассоциировано с развитием когнитивного дефицита и эмоциональной памяти.

Получены новые данные о механизмах развития церебральной амилоидной ангиопатии в результате хронической аккумуляции $A\beta$ 1-42. Впервые у мышей линии 5xFAD зарегистрированы подавление церебрального ангиогенеза за счет снижения экспрессии маркера эндотелия CD31 в гиппокампе, церебральные микрососудистые нарушения, которые сопряжены с увеличением в эндотелии гиппокампа экспрессии белка Fe65 и эндотелиальным накоплением $A\beta$ 1-42 в гиппокампе, а также повышением в церебральном эндотелии экспрессии рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE, что в совокупности вызывает повышение

проницаемости гемато-энцефалического барьера на фоне развития церебральной инсулинорезистентности.

При токсическом действии $A\beta$ 1-42 *in vitro* впервые показано, что в церебральном эндотелии подавление экспрессии RAGE (с применением siRNA RAGE) улучшает параметры целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что может быть использовано для коррекции патологической проницаемости гемато-энцефалического барьера при нейродегенерации, ассоциированной с развитием церебральной инсулинорезистентности и развитием RAGE-опосредованного нейровоспаления.

Разработана концепция патогенеза нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с развитием локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга. Так, острое токсическое действие $A\beta$ 1-42 или его хроническая аккумуляция вызывают развитие нарушений инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках нейроваскулярной единицы гиппокампа и миндалевидного тела, что проявляется в формировании нарушений экспрессии рецепторов инсулина и активируемых ими сигнальных молекул (IRS1, GSK-3 β , MAPK, IRAP, PKC); молекул, участвующих в реализации биологических эффектов $A\beta$ 1-42 (Fe65, RAGE), а также молекул-регуляторов проницаемости гематоэнцефалического барьера или неогенеза (молекул адгезии А плотных контактов JAM1, белка плотных соединений-1 ZO1, фактора роста эндотелия сосудов VEGF2), что обуславливает развитие aberrантной нейропластичности, когнитивного дефицита и амилоидной ангиопатии при развитии болезни Альцгеймера и сопровождается нарушением сложных форм поведения.

Теоретическая и практическая значимость работы

В рамках проведенного исследования значительно расширены представления о патогенезе болезни Альцгеймера, расшифрованы молекулярные механизмы нарушения продукции, транспорта и эффектов инсулина в клетках нейрональной и эндотелиальной природы, определена роль церебральной инсулинорезистентности в развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Полученные результаты об изменениях экспрессии рецепторов инсулина и активируемых ими сигнальных молекул, а также молекул, участвующих в реализации биологических эффектов $A\beta$ 1-42 при развитии болезни Альцгеймера, могут быть использованы при разработке методов ранней диагностики; данные о нарушении продукции инсулина и дисрегуляции в реализации им биологических эффектов в миндалевидном теле головного мозга при развитии болезни Альцгеймера обосновывают разработку новых подходов к восстановлению эмоционального статуса посредством коррекции механизмов церебральной инсулинорезистентности. Полученные новые экспериментально подтвержденные сведения о механизмах нарушения структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера могут послужить основой для разработки технологий контролируемой регуляции проницаемости гемато-энцефалического барьера и коррекции микроциркуляторных расстройств.

Полученные при проведении диссертационного исследования результаты внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, разработано учебное пособие для студентов и аспирантов; результаты внедрены в научный процесс НИИ

молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа имеет экспериментальный характер. В качестве объектов исследования использовали мышей-самцов линии CD1, мышей-самцов линии C57BL/6, мышей-самцов линии B6SLJ-Tg(APP^{SwFILon},PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799^{Vas} (5xFAD). Предметом исследования явилась оценка изменений в экспрессии молекул-маркеров церебральной инсулинорезистентности, ангиогенеза в экспериментальных группах, модель ГЭБ *in vitro*. Для реализации поставленных задач было проведено моделирование нейродегенерации альцгеймеровского типа, нейропсихическое тестирование животных с применением методов изучения тревожно-депрессивного поведения («Приподнятый крестообразный лабиринт», «Черно-белая камера»), когнитивных функций («Условно-рефлекторное замирание», «Восьмирукавный радиальный лабиринт», «Распознавание нового объекта»), социального поведения («Трехкамерный социальный тест»). С использованием иммуногистохимического исследования срезов головного мозга изучены молекулы-маркеры церебральной инсулинорезистентности, ангиогенеза, фенотипированы клетки различной природы. В ходе проведения исследований также были использованы такие методы как иммуоферментный анализ, электрофизиологическое исследование, ПЦР, моделирование ГЭБ *in vitro*. Была проведена статистическая обработка полученных результатов.

Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных для исследования на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ИПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» (выписка из протокола №3 от 29.10.2013 г.)

Исследования были выполнены с использованием ресурсной базы ЦКП МКТ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Положения, выносимые на защиту

1. Острое действие A β 1-42 приводит к развитию инсулинорезистентности за счет увеличения экспрессии гена *insulin I* в гиппокампе и миндалевидном теле, нарушения в нейронах экспрессии *IR* и *IRS1*, развития церебрального дисметаболизма глюкозы, дисфункции митохондрий. В нейронах миндалевидного тела острое действие A β 1-42 и его хроническая аккумуляция приводят к развитию инсулинорезистентности из-за дисбаланса экспрессии молекул-компонентов PI3K- и MAPK-пути.

2. В условиях острого нейротоксического действия A β 1-42 и при хронической его аккумуляции регистрируется накопление γ H2AX, что свидетельствует о генотоксическом эффекте A β 1-42. A β 1-42 изменяет инсулин-индуцированный паттерн возбудимости нейронов миндалевидного тела, что может лежать в основе формирования когнитивного дефицита и нарушения эмоциональных

реакций при развитии церебральной инсулинорезистентности при нейродегенерации альцгеймеровского типа.

3. Хроническая аккумуляция Аβ1-42 приводит к нарушению структурной целостности гемато-энцефалического барьера за счет увеличения в эндотелии гиппокампа экспрессии Аβ1-42, а также молекул, участвующих в реализации биологических эффектов Аβ1-42 (Fe65, RAGE), нарушения церебрального ангиогенеза и ремоделирования сосудистой сети, повышения проницаемости гемато-энцефалического барьера.

4. Моделирование болезни Альцгеймера *in vitro* сопровождается повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера, что сопряжено с нарушением церебрального ангиогенеза, увеличением экспрессии в эндотелии рецепторов конечных продуктов гликирования белков RAGE. Подавление экспрессии белков RAGE оказывает положительный эффект на структурно-функциональную целостность ГЭБ. В церебральном эндотелии увеличение экспрессии RAGE *in vivo* и *in vitro* является маркером инсулинорезистентности и повреждения ГЭБ при нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Степень достоверности и апробация результатов

Экспериментальные данные получены с использованием современных методических подходов, валидированных моделей болезни Альцгеймера на экспериментальных животных, высокоинформативных методов исследования (иммуногистохимия, иммуноферментный анализ, электрофизиологическое исследование, ПЦР, различные протоколы получения первичных клеточных культур и культивирования клеток, получение и применение срезов ткани головного мозга, спектрофлуориметрия), современного оборудования, формированием выборки животных в соответствии с основным принципом работы с лабораторными животными – «принципом 3R». Для статистической обработки полученных результатов использованы адекватные методы математической статистики. Научные положения и выводы аргументированы полученными результатами.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: Типовые патологические процессы: современные тренды в науке (Томск, 2020); Постгеномные технологии: от теории к практике (Воронеж, 2019); XII межрегиональная научно-практическая конференция «Химическая наука и образование Красноярья» (Красноярск, 2019); Заболевания мозга: вызов XXI века (Казань, 2018); XI межрегиональная научно-практическая конференция «Химическая наука и образование Красноярья» (Красноярск, 2018); *Frontiers in Metabolism* (Lausanne, 2018); *NeuroFrance 2017* (Bordeaux, France, 2017); *Proceedings 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society* (Göttingen, 2017); XXIII съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); XIII Международный Междисциплинарный Конгресс (Судак, 2017); X юбилейная Межрегиональная научно-практическая конференция «Химическая наука и образование Красноярья» (Красноярск, 2017); V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России (Сочи, 2016); IX Межрегиональная научно-практическая конференция «Химическая наука и образование Красноярья» (Красноярск, 2016); 2-ой междисциплинарный симпозиум и молодежный форум по медицинской,

органической и биологической химии (Крым, 2015); International Congress on Neuroscience (Krasnoyarsk, 2014); Системно-технические решения проблем визуализации в нейродегенерации (Санкт-Петербург, 2013).

Эксперименты в рамках диссертационной работы проведены при поддержке грантов Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ: НШ-10241.2016.7 «Молекулярные механизмы инсулинорезистентности в ткани головного мозга при хронической нейродегенерации» (2016-2017 гг.); НШ-6240.2018.7 «Молекулярные механизмы повреждения гематоэнцефалического барьера и нарушений микроциркуляции при хронической нейродегенерации» (2018-2019 гг.); НШ--2547.2020.7 «Молекулярные механизмы повреждения и восстановления митохондрий клеток нейрональной и эндотелиальной природы при хронической нейродегенерации» (2020-2021 гг.).

Публикации

По результатам работы опубликовано 35 работ, в том числе 23 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК; 11 статей в изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science и/или Scopus (Q1-Q2), 1 монография.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа оформлена в соответствие с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011, изложена на 417 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 878 источников (24 отечественных и 854 иностранных). Диссертация иллюстрирована 5 таблицами, 69 рисунками.

Личный вклад соискателя

Лично автором получены основные научные результаты по исследуемой теме. Вместе с научным консультантом определены цель, задачи, объем исследования, а также его этапы и направления. Лично соискателем разработаны схемы и протоколы экспериментов, сформированы экспериментальные группы животных. Соискатель осуществляла детальную работу с научной литературой, моделирование нейродегенерации альцгеймеровского типа (совместно с к.м.н. Черных А.И. и аспирантом Потапенко И.В.), выполняла нейроповеденческое тестирование животных, иммуногистохимическое исследование и иммуноферментный анализ (в том числе совместно с д.м.н., доцентом Ю.К. Комлевой и д.б.н., доцентом О.Л. Лопатиной). Электрофизиологические исследования выполнены совместно с к.м.н. А.Н. Шуваевым и аспирантом И.В. Потапенко. Моделирование ГЭБ и исследования *in vitro* выполнены совместно с д.м.н. А.В. Моргуном, н.с. Е.Д. Хилажевой. Автором лично проведена статистическая обработка экспериментальных данных, интерпретация полученных результатов, подготовка публикаций и написание всех разделов диссертационной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, определены цель, задачи исследования, научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, в частности, описаны характерные особенности БА, современные модели БА. Основная часть главы посвящена роли церебральной инсулинорезистентности в развитии нейродегенерации и метаболических нарушений. Описано значение рецептора инсулина и его субстрата в инсулин-сигнализации. Дана характеристика инсулин-сигнальных путей и их роль в развитии БА. Также дана информация о значении инсулина в реализации когнитивных функций в норме и при БА. Охарактеризованы потенциальные молекулы-маркеры и молекулы-мишени церебральной инсулинорезистентности. Глава иллюстрирована рисунками и таблицами.

Во второй главе диссертации описаны материал и методы исследования. Объект исследования: мыши-самцы линии CD1, в возрасте 4 месяцев; мыши-самцы линии C57BL/6 в возрасте 4; мыши-самцы линии 5xFAD (трансгенная модель БА) на генетическом фоне C57BL/6. Общее количество животных, использованных при выполнении работы, составило n= 200.

В исследованиях *in vitro* источником клеток служили мыши-самцы линии C57BL/6.

Дизайн исследования и экспериментальные группы.

Исследовательская работа состояла из 10 блоков, представленных на рисунке 1.

1-й блок – оценка экспрессии мРНК инсулина в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга в норме и при экспериментальной БА: Группа №1 – мыши линии C57BL/6 с введением PBS – ложно-оперированные животные (n=7); группа №2 – мыши линии C57BL/6 с введением A β 1-42 – инъекционная модель БА (n=7).

2-й блок – оценка уровня лактата и инсулина в различных регионах головного мозга (гиппокамп, миндалевидное тело, ольфакторная луковица) в норме и при экспериментальной БА: Группа №1 – мыши линии C57BL/6 с введением PBS – ложно-оперированные животные (n=10); группа №2 – мыши линии C57BL/6 с введением A β 1-42 – инъекционная модель БА (n=10).

3-блок – иммуногистохимический анализ молекул-маркеров инсулинорезистентности (IR, IRS1, IRAP, GLUT4, MAPK, PKC, GSK-3 beta, Fe65, A β 1-42, RAGE) в различных регионах головного мозга (гиппокамп, миндалевидное тело) в норме и при экспериментальной БА: Группа №1 – мыши линии C57BL/6 с введением PBS – ложно-оперированные животные (n=7); группа №2 – мыши линии C57BL/6 с введением A β 1-42 – инъекционная модель БА (n=7); группа №3 – мыши линии CD1 с введением PBS – ложно-оперированные животные (n=7); группа №4 – мыши линии CD1 с введением A β 1-42 – инъекционная модель БА (n=7); группа №5 – мыши линии C57BL/6 – контрольная группа (n=5); группа №6 – мыши линии 5xFAD – генетическая модель БА (n=5).

4-й блок – оценка изменения проницаемости ГЭБ *in vivo*, церебрального ангиогенеза и микроциркуляции в норме и при экспериментальной БА: Группа №1 – мыши линии C57BL/6 – контрольная группа (n=5); группа №2 – мыши линии 5xFAD – генетическая модель БА (n=5).

5-й блок – изучение особенностей нейропластичности и синаптической передачи в различных отделах головного мозга (гиппокамп и миндалевидное тело) в норме и при экспериментальной БА: Группа №1 – мыши линии C57BL/6 с введением PBS – ложно-оперированные животные (n=10); группа №2 – мыши линии C57BL/6 с введением A β 1-42 – инъекционная модель БА (n=10).

6-й блок – изучение особенностей реализации эмоций и когнитивных функций в норме и при экспериментальной БА: Группа №1 – мыши линии C57BL/6 – контрольная группа (n=5); группа №2 – мыши линии 5xFAD – генетическая модель БА (n=5).

7-й блок – оценка экспрессии RAGE в клетках эндотелия церебральных микрососудов, маркера ангиогенеза (VEGFR2), белков плотных и адгезивных контактов церебрального эндотелия (JAM1 и ZO1) в модели ГЭБ *in vitro* в норме и при экспериментальной БА: Контрольная I – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях статической модели ГЭБ *in vitro* (n=5); опытная I – эндотелиоциты, которые культивировались в статической модели ГЭБ *in vitro* в присутствии 10 мкМ A β 1-42 (моделирование экспериментальной БА) (n=5); контрольная II – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях закрытой динамической модели ГЭБ *in vitro* (n=5); опытная II – эндотелиоциты, которые культивировались в условиях закрытой динамической модели ГЭБ *in vitro* в присутствии 10 мкМ A β 1-42 (моделирование экспериментальной БА) (n=5). Контрольная III – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ; опытная III – эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ в присутствии 10 мкМ A β 1-42 (моделирование экспериментальной БА).

8-блок – оценка трансэндотелиального сопротивления (ТЭС) при модуляции RAGE (блокирование экспрессии RAGE с помощью siRNA RAGE, химическая модуляция лигандом RAGE - A β 1-42) в клетках эндотелия церебральных сосудов в составе модели ГЭБ *in vitro* в норме и при экспериментальной БА: Группа №1 – клетки, которые были выделены от ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) (n=5); группа № 2 – клетки, которые были выделены от животных с инъекционной моделью БА (C57BL/6+A β 1-42) (n=5). В каждой группе было создано по 3 подгруппы: интактные – культура эндотелиоцитов без воздействия химических модуляторов и siRNA; siRNA RAGE – эндотелиоциты после добавления siRNA RAGE; A β 1-42 – эндотелиоциты после добавления A β 1-42.

9-й блок – изучение особенностей проницаемости эндотелиальных клеток ГЭБ для высокомолекулярных соединений (FITC-декстрана) *in vitro* при модуляции RAGE в норме и при экспериментальной БА: Исследование проводили на экспериментальных группах, представленных в 8 блоке.

10-блок – изучение экспрессии маркеров ангиогенеза (VEGFR2 и CD34) при RAGE-модуляции в эндотелиальных клетках церебральных сосудов в составе

модели ГЭБ *in vitro*: Исследование проводили на экспериментальных группах, представленных в 8 блоке.

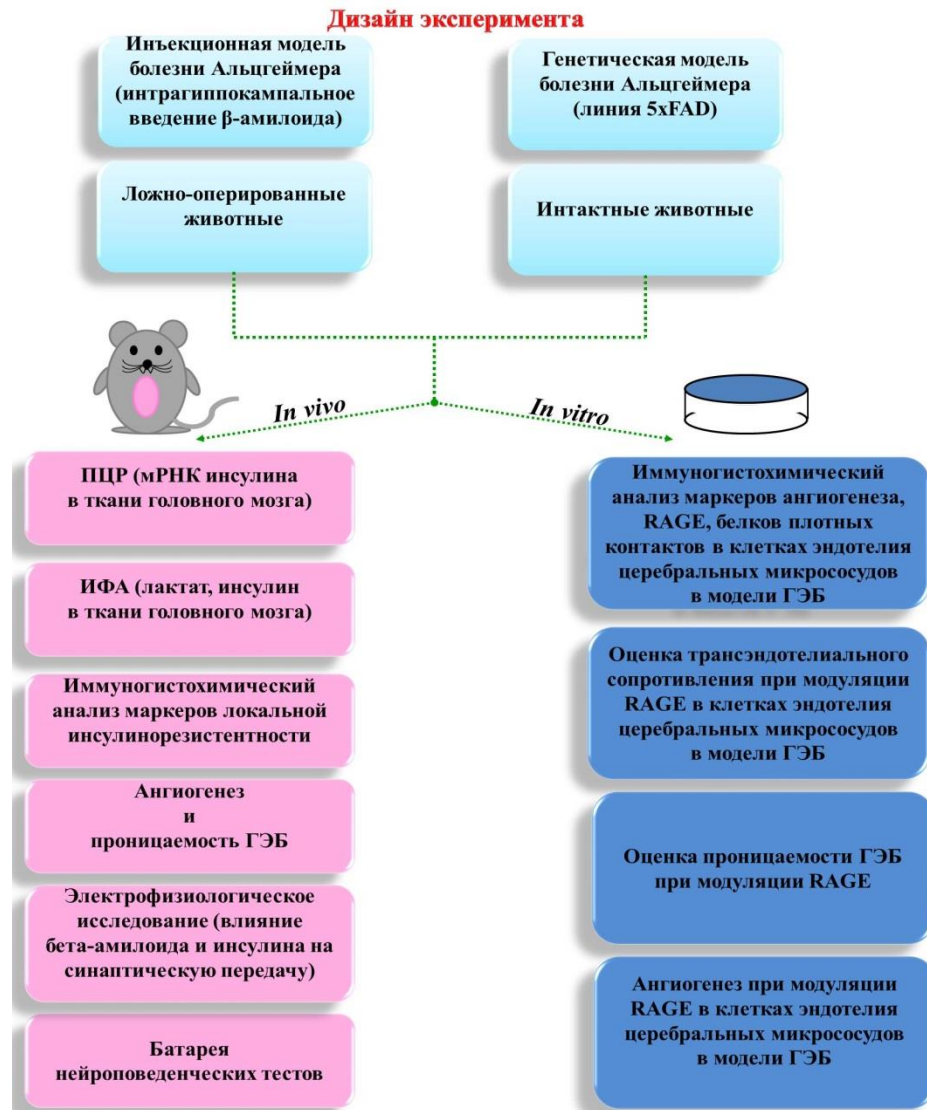


Рисунок 1 – Дизайн блока исследовательской работы

Моделирование болезни Альцгеймера осуществляли с помощью стереотаксического метода согласно протоколу введения растворимых олигомерных форм A β 1-42 в CA1 зону в гиппокампа мышей [Epelbaum S., 2015].

Нейроповеденческое тестирование проводили для изучения тревожно-депрессивного поведения с использованием тестов «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Черно-белая камера», когнитивных функций – «Условно-рефлекторное замирание», «Восьмирукавный радиальный лабиринт», «Распознавание нового объекта», социального поведения «Трехкамерный социальный тест».

Иммуногистохимическое исследование и конфокальная микроскопия. На 12 день через 30 мин после тестирования в восьмирукавном радиальном лабиринте проводили транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом с последующим забором головного мозга. С помощью микротомы Thermo Scientific Microm HM 650 изготавливали срезы толщиной 50 мкм, которые окрашивали согласно стандартному

протоколу двойного/тройного мечения методом иммуногистохимии для свободно плавающих срезов.

Для исследования молекул-маркеров церебральной инсулинорезистентности, ангиогенеза, фенотипирования клеток различной природы использовали следующие антитела: IRAP (Insulin-responsive aminopeptidase, Santa Cruz Biotechnology, sc-365300, rabbit monoclonal) 1:1000, GLUT4 (Glucose Transporter, Abcam, ab654, rabbit monoclonal) 1:1000, NeuN (Neuronal nuclei, Abcam, ab90, guinea pig polyclonal) 1:1000, GFAP (Glial fibrillary acidic protein, Santa cruz, sc-58766, mouse monoclonal) 1:1000, MAPK (Mitogen-activated protein kinase, ERK1/2, Sigma-Aldrich, M5670, rabbit polyclonal) 1:1000, IRS1 (Insulin receptor substrate 1, Abcam, ab66154, rabbit polyclonal) 1:1000, PKC (Protein kinase C, Abcam, ab23513, rabbit polyclonal) 1:1000, GSK-3 beta (Glycogen synthase kinase 3 beta, Abcam, ab69739, rabbit polyclonal) 1:1000, IR (Insulin receptor, Abcam, ab137747, rabbit monoclonal) 1:1000, CD31 (PECAM-1)-FITC (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, Sigma Aldrich, F8402, mouse monoclonal) 1:1000, RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts, Abcam, ab3611, rabbit monoclonal) 1:1000, Abeta (Amyloid beta, ABIN3183281, rabbit polyclonal) 1:1000, Fe65 (Thermo Fisher Scientific, PA5-18560, rabbit polyclonal) 1:1000, γ H2AX (gamma histone family member X, Abcam, ab11174, rabbit polyclonal). Изображения были получены на конфокальном флуоресцентном микроскопе (Olympus FluoView) с использованием объектива (60 \times). Обработку осуществляли с помощью программного обеспечения Olympus FluoView software (Ver.4.0a). Оценивали три поля зрения. Результаты представлены в виде относительного количества иммунопозитивных клеток.

Иммуноферментный анализ. Уровень инсулина и лактата в гомогенатах гиппокампа, миндалевидного тела и ольфакторной луковицы определяли с использованием иммуноферментных наборов реагентов (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA kit; L-Lactate Assay Kit Colorimetric/Fluorometric).

Оценка митохондриального трансмембранного потенциала. Проводили с использованием иммуноферментного набора MITOISO2 (Sigma Aldrich, США) в ткани гиппокампа по стандартному протоколу фирмы-производителя.

ПЦР-анализ. Уровень экспрессии гена инсулина (insulin I (Ins1), gene ID - 16333, ensemble - ENSMUSG00000035804) в различных регионах головного мозга определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием набора реагентов по стандартному протоколу.

Электрофизиологическое исследование. Для этого использовались коронарные срезы головного мозга, которые помещались в ледяной (+4 $^{\circ}$ C) раствор искусственной спинномозговой жидкости (иСМЖ), перфузируемой смесью газов 5%CO₂ и 95% O₂. Регистрация пВПСП производилась с помощью Cl-Ag электрода в стеклянной боросиликатной пипетке, заполненного иСМЖ. Стимуляция пресинаптических волокон производилась с помощью платино-иридиевого электрода с сопротивлением 5 М Ω . Запись потенциалов и стимуляция производилась с помощью усилителя НЕКА EPC10 USB с CA1 и CA3 зон гиппокампа и базолатерального комплекса миндалевидного тела. Данные образования визуально определялись по характерным формам при увеличении объектива x10.

Оценка особенностей формирования сосудистой сети (ангиогенез).

Проводилась микроскопическим методом с использованием микроскопа ZOE с фотофиксацией и последующей обработкой полученных фотографий в программе ImageJ v1.43 (США). Подсчитывали общую длину сосудистой сети, количество видимых сосудов, число точек ветвлений сосудов и средний диаметр сосудов в 1 мм³ ткани гиппокампа в областях CA1, CA2, CA3, зубчатая извилина (DG).

Оценка проницаемости ГЭБ in vivo. Проводили путем оценки проницаемости красителя Evans blue в срезах головного мозга согласно протоколу [Manaenko A., 2011]. С помощью конфокального флуоресцентного микроскопа подсчитывали в процентах площадь флуоресценции красителя Evans blue от общей площади сосудов в поле зрения.

Выделение церебральных эндотелиоцитов. Источником клеток головного мозга служили мыши в C56Bl/6 возрасте 4 месяцев. Выделение проводили по модифицированному протоколу [Liu Y., 2013]. Культивирование клеток осуществляли в культуральных флаконах в среде, состоящей из DMEM, 20% раствора FBS, глюкозы 3 мг/мл, глутамин 0,58 мг/мл, стрептомицин 100 мг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл.

Выделение и культивирование нейросфер. Источником клеток головного мозга служили мыши в C56Bl/6 возрасте 4 месяцев. Выделение клеток проводили по методике [Моргун А.В., 2016]. Клетки в количестве 1,5x10⁶ клеток/мл сеяли в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Инкубировали при 5% CO₂ и 37°C. Образование нейросфер наблюдали через 24-48 ч.

Получение астроцитов и нейронов. Проводили из нейросфер за счет направленной дифференцировки в астроциты и нейроны [Моргун А.В., 2013]. Осуществляли дифференцировку нейросфер в астроциты и нейроны в культуральной среде NeuroCult NS-A Differentiation Kit.

Разработка статической и динамической модели ГЭБ in vitro. Источником клеток головного мозга служили мыши в C56Bl/6 возрасте 12-14 суток. При создании статической модели ГЭБ in vitro использовали 24-луночный планшет, на дно которого засеивали нейроны и астроциты. Церебральные эндотелиоциты добавляли на культуральные вставки. Проводили сокультивирование клеточных компонентов ГЭБ в среде DMEM с 10% раствором FBS, 100 мкг/мл пенициллин и 100 мг/мл стрептомицин, 0,58 мг/мл глутамин в условиях CO₂-инкубатора. Для моделирования экспериментальной БА к клеткам добавляли A β 1-42 в концентрации 10 мкМ в питательной среде. Время культивирования составило 48 ч.

В эксперименте были использованы два варианта динамической модели ГЭБ in vitro: коммерческая закрытая система для микроперфузии CellASIC ONIX (Merck Millipore); открытая система на основе перфузируемых вставок и использования культурального 24-луночного планшета.

Для создания закрытой динамической модели ГЭБ в камеру планшета для микрофлюидной установки засеивали клетки-компоненты ГЭБ, чтобы сформировать трехмерную модель. Проводили культивирование клеток в среде DMEM с 10% раствором FBS, 100 ЕД/мл пенициллин и 100 мг/мл стрептомицин, 0,58 мг/мл

глутамин, при 37°C, 5% CO₂ и скорости потока культуральной среды 1,25 мкл/ч в течение 48 ч. Для моделирования экспериментальной БА к клеткам добавляли A β 1-42 в концентрации 10 мкМ в питательной среде. Время культивирования составило 48 ч.

При разработке открытой динамической модели ГЭБ принимали во внимание возможность применения шприцевого насоса со стеклянными шприцами типа Hamilton.

Регистрация трансэндотелиального электрического сопротивления *in vitro*. Для измерения ТЭС использовали эпителиальный вольтметр EVOM2 и электрод STX2. Регистрацию осуществляли при формировании модели ГЭБ (статической и открытой динамической) *in vitro*.

Модуляция экспрессии RAGE и регистрация ТЭС *in vitro*. Для блокировки экспрессии RAGE в клетках эндотелия использовали siRNA RAGE. Трансфекцию siRNA проводили методом электропорации с применением системы трансфекции Nucleofector 2b Device и набора Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Endothelial Cells согласно протоколу, который рекомендован фирмой-производителем. Для химической модуляции RAGE использовали мышиный A β 1-42 в конечной концентрации 1 мкМ, инкубацию проводили в течение 1 ч.

Оценка проницаемости ГЭБ *in vitro*. Проводили с помощью регистрации концентрации FITC-меченого декстрана в среде из разных компартментов лунок культурального планшета с использованием спектрофлуориметра CM 2203 при длине волны – 488/520 нм.

Оценка особенностей ангиогенеза *in vitro*. Проводили в клетках эндотелия методом иммуногистохимии с использованием первичных антител к CD34 (Abcam, ab81289, rabbit monoclonal), VEGFR2 (Abcam, ab2349, rabbit polyclonal). Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE. Результаты представлены как относительное количество всех клеток, несущих интересующую метку/метки, выраженное в процентах от общего количества клеток. Оценивали не менее 10 полей зрения.

Статистический анализ. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы “GraphPad Prizm 8.0.1 (версия 8.0, США). Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности распределения. При отсутствии условий нормальности распределения сравнение двух групп проводили с использованием непараметрического U-критерий Манна-Уитни. Сравнение внутри групп проводили с использованием критерия Уилкоксона. При сравнении более двух групп, а также для оценки взаимосвязи двух переменных (например, Генотип \times Возраст, Генотип \times Интрагиппокампальная инъекция и др.) применяли непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса). Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью post-hoc Sidak’s, Tukey’s или Bonferroni’s тестов множественных сравнений.

Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M (Mean) – среднее значение, m (S.E.M.) – стандартная ошибка среднего. Различия принимали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Третья глава диссертационной работы посвящена описанию полученных результатов. Глава иллюстрирована рисунками и таблицами.

Четвертая глава диссертации посвящена анализу и обсуждению полученных результатов с использованием данных по исследуемой теме, которые представлены в современной научной литературе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспрессия гена *insulin I* в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга в норме и в условиях острого токсического действия $A\beta 1-42$ (инъекционная модель БА)

На сегодняшний день продолжают научные дискуссии относительно синтеза инсулина в ЦНС. Результаты доклинических и клинических исследований носят неоднозначный характер [Ghasemi R., 2013; Rhea E. M., 2020; Takano K., 2018].

Нами выявлено, что при остром токсическом действии $A\beta 1-42$ уровень экспрессии гена *insulin I* в гиппокампе животных статистически значимо выше ($5,96 \pm 0,95$ у.е.) по сравнению с ложно-оперированными животными ($1,27 \pm 0,23$ у.е.) при $P=0,0043$. Аналогичная ситуация наблюдается и в миндалевидном теле головного мозга (Рисунок 2). Это может быть связано с включением компенсаторных механизмов в ответ на нейротоксическое действие $A\beta 1-42$, а также его конкурентное связывание с рецептором инсулина.

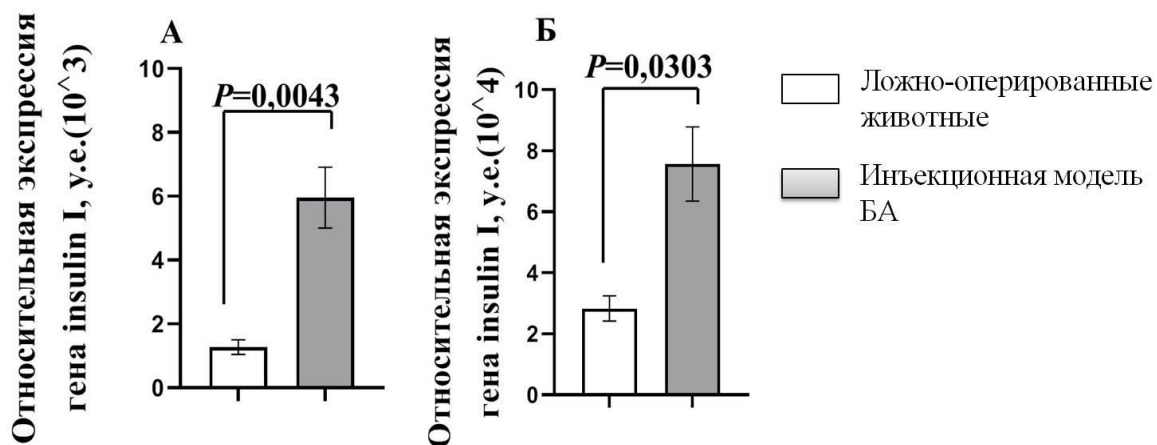


Рисунок 2 – Нарушение экспрессии мРНК инсулина в различных областях головного мозга при экспериментальной БА: (А) в гиппокампе; (Б) в миндалевидном теле (* $P < 0,05$ – сравнение с группой ложно-оперированных животных).

Экспрессия *IR* и *IRS1* в нейронах гиппокампа головного мозга при остром токсическом действии $A\beta 1-42$ (инъекционная модель БА)

Несколько клинических исследований продемонстрировали развитие нарушения связывания инсулина с его рецептором, а также снижение экспрессии инсулинового рецептора, предполагая, что указанные изменения могут взаимосвязаны с нейропатологическими признаками БА.

Нами выявлено, что в условиях острого токсического действия $A\beta 1-42$ статистически значимо снижается экспрессия *IR* в нейронах гиппокампа животных ($9,77 \pm 0,88\%$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($15,77 \pm 1,27\%$) при

$P=0,0089$. В нейронах гиппокампа животных с инъекционной моделью БА также значительно уменьшается уровень экспрессии IRS1 ($4,95\pm 0,51\%$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($12,75\pm 2,05\%$) ($P=0,0070$).

Таким образом, установленная дисрегуляция IR и IRS1 в результате острого нейротоксического действия $A\beta 1-42$ препятствует дальнейшей передаче сигналов вниз по PI3K- и MAPK-инсулин-сигнальным путям, приводя, в конечном итоге, к развитию церебральной инсулинорезистентности.

Уровень лактата в различных регионах головного мозга в норме и в условиях острого токсического действия $A\beta 1-42$ (инъекционная модель БА)

Согласно клиническим исследованиям нарушение церебрального метаболизма глюкозы может развиваться уже на ранней стадии развития БА, и сопровождается изменением в экспрессии глюкозных транспортеров, ключевых ферментов, участвующих в гликолизе и окислительном фосфорилировании.

При исследовании концентрации продукта метаболизма глюкозы – лактата в различных отделах головного мозга нами установлено взаимное влияние *интрагиппокампальная инъекция $A\beta 1-42$ × область головного мозга* ($F(2,37)=4,56$, $P=0,0169$, критерий Краскелла-Уоллиса) (Рисунок 3).

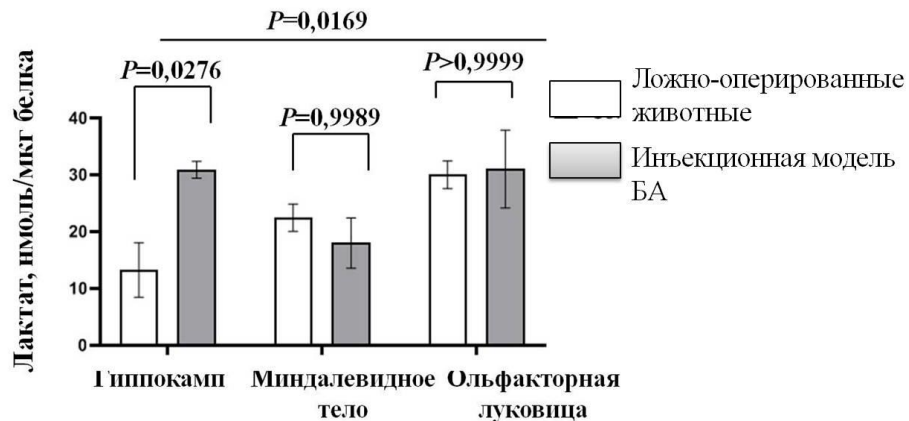


Рисунок 3 – Изменение уровня лактата в различных регионах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Выявлено, что при остром токсическом действии $A\beta 1-42$ происходит статистически значимое ($P=0,0276$) повышение уровня лактата в гиппокампе животных (инъекционная модель БА) по сравнению с ложно-оперированными животными. При этом существенных различий в уровне лактата в миндалевидном теле ($P=0,9989$) и ольфакторной луковице ($P>0,9999$) головного мозга между 2-мя исследуемыми группами не наблюдали (Рисунок 3).

Таким образом, полученные нами данные о повышении уровня лактата в гиппокампе мышей с инъекционной моделью БА может быть объяснено усилением поглощения глюкозы неповрежденными нейронами в качестве защитного механизма от нейротоксического действия $A\beta 1-42$, используя при этом энергетически неэффективный метод окисления глюкозы путем гликолиза с образованием лактата, тем самым повышая свою устойчивость к апоптозу.

Экспрессия инсулинрегулируемой аминопептидазы (IRAP) совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером (GLUT4) в миндалевидном теле головного мозга при остром токсическом действии $A\beta$ 1-42 (инъекционная модель БА)

По результатам доклинических исследований выдвинуто предположение, согласно которому IRAP может играть существенную роль в транслокации GLUT4 к мембране нервной клетки. Поэтому ингибирование его экспрессии $A\beta$ 1-42 может привести к снижению активности транспортеров глюкозы и, как следствие, развитию дисметаболизма глюкозы.

Нами установлено, что острое токсическое действие $A\beta$ 1-42 вызывает значимое снижение уровня экспрессии IRAP совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером GLUT4 ($8,99 \pm 1,38\%$) по сравнению с ложно оперированными животными ($17,33 \pm 2,16\%$) при $P=0,0159$ (Рисунок 4).

Таким образом, уменьшение уровня IRAP/GLUT4 в результате острого нейротоксического действия $A\beta$ 1-42 может способствовать нарушению захвата глюкозы и ее транспорта к нейронам и глиальным клеткам, что приводит к нарушению метаболизма глюкозы в головном мозге.

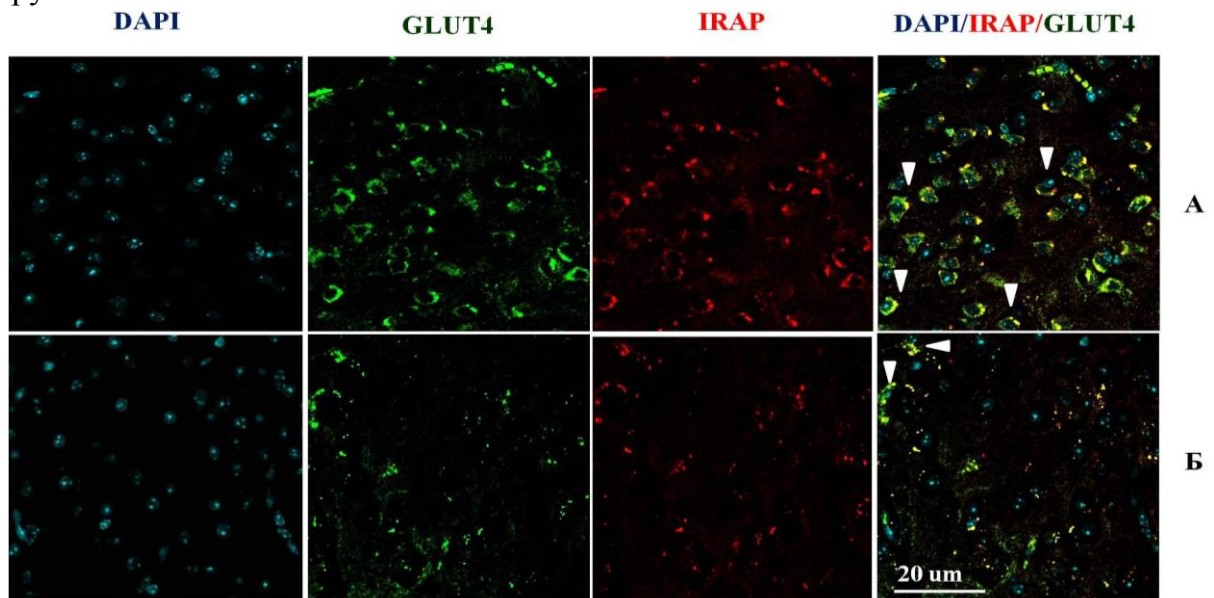


Рисунок 4 – Иммуногистохимический анализ экспрессии IRAP совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером GLUT4 в миндалевидном теле головного мозга животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия IRAP+клеток (красный), GLUT4+клеток (зеленый), DAPI-ядра (голубой) в миндалевидном теле головного мозга в экспериментальных группах: (А) ложно-оперированные животные, (Б) животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера. Стрелками обозначены клетки, несущие целевую метку.

Оценка трансмембранного потенциала митохондрий в гиппокампе головного мозга животных в норме и в условиях острого токсического действия $A\beta$ 1-42 (инъекционная модель БА)

Для этого нами было оценено поглощение JC-1 митохондриями в гиппокампе головного мозга – липофильного положительно заряженного красителя, способного проникать и накапливаться внутри митохондрий, формируя комплексы – J-агрегаты.

Выявлено нарушение митохондриального окислительного метаболизма в клетках головного мозга при развитии нейродегенерации (в условиях острого токсического действия $A\beta 1-42$) что проявляется в виде увеличения аккумуляции JC-1 в митохондриях клеток гиппокампа животных ($0,32 \pm 0,004$) при сравнении с группой с ложной операцией ($0,21 \pm 0,005$) при ($P=0,0020$).

Экспрессия молекул - компонентов инсулин-сигнального пути в нейронах миндалевидного тела головного мозга при остром токсическом действии $A\beta 1-42$ (инъекционная модель БА) и его хронической аккумуляции (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD)

Показано, что острое токсическое действие $A\beta 1-42$ вызывает значимое снижение экспрессии IRS1 на нейронах в миндалевидном теле головного мозга мышей с инъекционной моделью БА ($21,16 \pm 1,98\%$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($31,67 \pm 2,78\%$) при $P=0,0317$. Аналогичные изменения наблюдается и в условиях хронической аккумуляции $A\beta 1-42$ (генетическая модель БА – мыши линии 5xFAD) ($P=0,0419$).

Установлено, что в условиях острого токсического действия $A\beta 1-42$ происходит статистически значимое ($P=0,0159$) уменьшение экспрессии РКС (молекула-компонент PI3K/Akt-пути) на нейронах в миндалевидном теле головного мозга животных с инъекционной моделью БА по сравнению с ложно-оперированными животными. При хронической аккумуляции $A\beta 1-42$ статистически значимых изменений не установлено ($P=0,0954$).

Обнаружено, что острое токсическое действие $A\beta 1-42$ вызывает значимое ($P=0,0079$) увеличение уровня экспрессии GSK-3beta (молекула-компонент PI3K/Akt-пути) на нейронах миндалевидного тела головного мозга мышей с инъекционной моделью БА по сравнению с ложно-оперированными животными. Подобная ситуация наблюдалась и при хронической аккумуляции $A\beta 1-42$ при $P=0,0059$.

В результате исследования установлено, что острое токсическое действие $A\beta 1-42$ вызывает значимое снижение ($P=0,0079$) экспрессии IRAP нейронами в миндалевидном теле головного мозга мышей с инъекционной моделью БА ($10,57 \pm 1,17$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($20,46 \pm 1,48$). Подобные изменения наблюдалась и при хронической аккумуляции $A\beta 1-42$ при $P=0,0074$.

Выявлено, что при остром токсическом действии $A\beta 1-42$ происходит значимое снижение ($P=0,0079$) уровня экспрессии митоген-активированной протеинкиназы (MAPK (ERK1/2)) (молекула-компонент MAPK-пути) на нейронах миндалевидного тела головного мозга мышей с инъекционной моделью БА ($5,37 \pm 0,58\%$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($14,11 \pm 1,05\%$). Хроническая аккумуляция $A\beta 1-42$ оказывала аналогичный эффект ($P=0,0080$) (Рисунок 5).

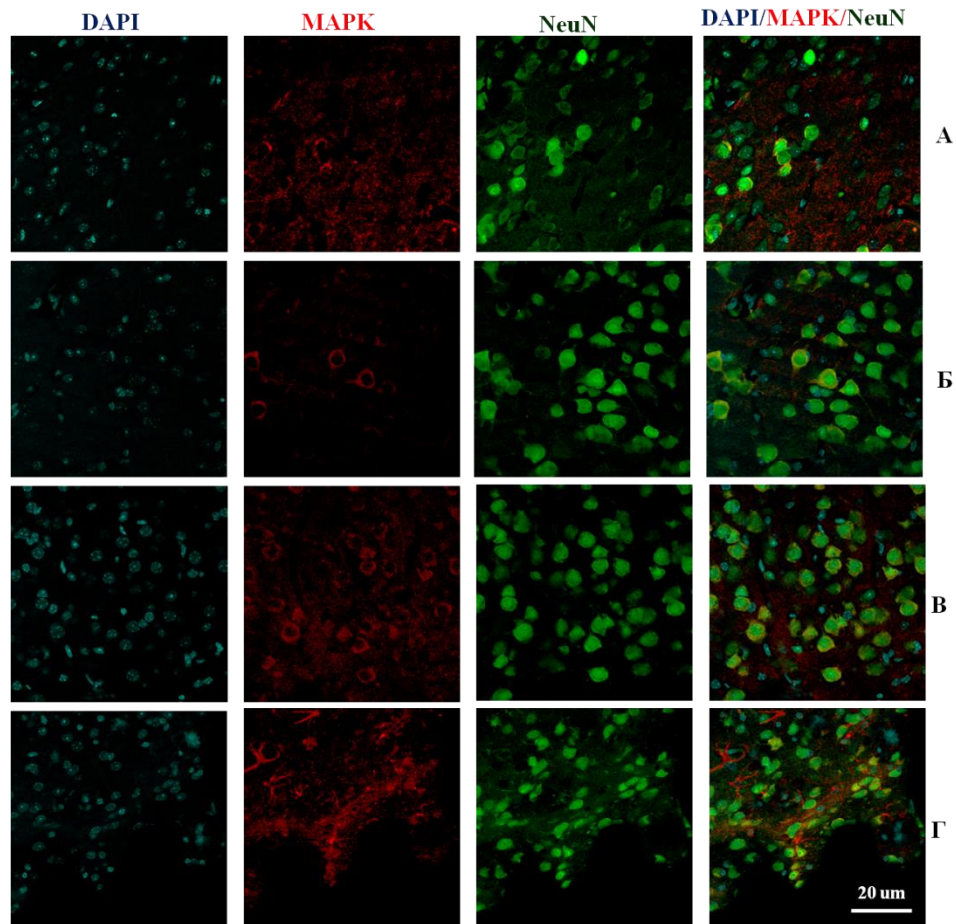


Рисунок 5 – Иммуногистохимический анализ экспрессии MAPK на нейронах в миндалевидном теле головного мозга животных разных экспериментальных групп

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия MAPK+клеток (красный), NeuN+клеток (зеленый), DAPI-ядра (голубой) в миндалевидном теле головного мозга в экспериментальных группах: (А) ложно-оперированные животные, (Б) животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера, (В) контрольная группа (линия C57BL/6), (Г) животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (мыши линии 5xFAD).

Таким образом, как в условиях острого токсического действия A β 1-42 (инъекционная модель БА), так и при его хронической аккумуляции (генетическая модель БА) наблюдается выраженный дисбаланс экспрессии в нейронах миндалевидного тела молекул-компонентов инсулин-сигнальных PI3K-пути (PKC, GSK-3 beta) и MAPK-пути (MAPK (ERK1/2), а также инсулинрегулируемой аминокислоты IRAP.

Экспрессия маркера ангиогенеза CD31 в субрегионах гиппокампа при хронической аккумуляции A β 1-42 (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD)

Нами установлено, что при хронической аккумуляции A β 1-42 неоангиогенез в гиппокампе подавляется, о чем указывает большее снижение количества CD31+ эндотелиальных клеток в зубчатой извилине гиппокампа ($21,50 \pm 0,99\%$) при сравнении с контрольной группой ($24,31 \pm 1,42\%$) при $P=0,2297$. Подобная картина наблюдалась в CA2 и CA3 областях гиппокампа. При этом исключение составляет

CA1 область гиппокампа, в которой высокий уровень экспрессии CD31-позитивных клеток сохраняется ($28,94 \pm 1,72\%$ против $21,39 \pm 1,76\%$ группы контроля, $P=0,0285$).

Особенности формирования сосудистой сети в гиппокампе (ангиогенез и ремоделирование сосудистой сети) при хронической аккумуляции A β 1-42 (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD)

Нами установлено, что общая длина сосудов в области зубчатой извилины у животных с генетической моделью БА в 2,5 раза больше, чем у животных контрольной группы ($P=0,0087$) (Рисунок 6).

В то же время общее количество сосудов в зубчатой извилине и в области CA1 превосходило показатели контрольных животных в 3 (при $P=0,0085$) и 2,5 раза (при $P=0,0067$), соответственно. При этом, у животных контрольной группы число точек ветвлений сосудов значимо ($P<0,05$) выше (в 1,5-2 раза) в CA1, CA2, CA3 областях гиппокампа по сравнению с животными с генетической моделью БА. Стоит отметить, что средний диаметр сосудов у животных с генетической моделью БА значимо ($P<0,05$) меньше по сравнению с животными контрольной группы во всех областях гиппокампа (Рисунок 6).

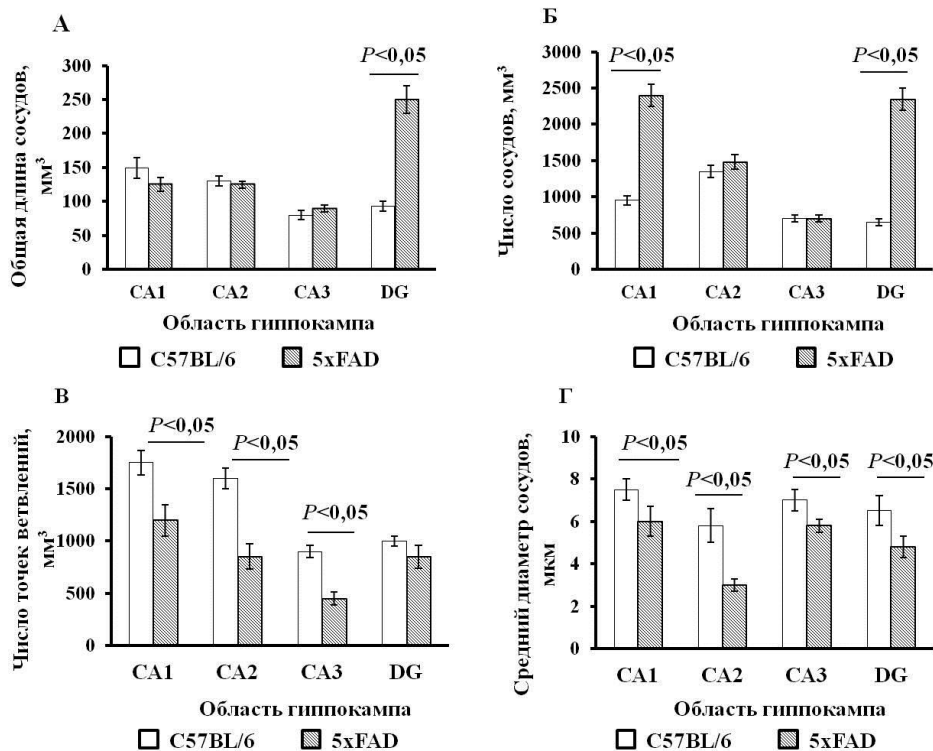


Рисунок 6 – Особенности сосудистой сети (ангиогенеза) в отдельных областях гиппокампа в норме и при хронической аккумуляции бета-амилоида 1-42 (генетическая модель болезни Альцгеймера). (А) общая длина сосудов, мм³; (Б) число сосудов, мм³; (В) число точек ветвлений, мм³; (Г) средний диаметр сосудов, мкм. (* $P<0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean \pm S.E.M., n=10. CA1, CA2, CA3 и DG (зубчатая извилина) – области гиппокампа.

Таким образом, при хронической аккумуляции A β 1-42 в ткани головного мозга фиксируются значимые патологические изменения в микрососудистом русле гиппокампа, причем наиболее выраженные в CA1 области гиппокампа.

Проницаемость ГЭБ *in vivo* при хронической аккумуляции Аβ1-42 (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD)

Мы провели оценку проницаемости ГЭБ с помощью красителя Evans blue, который используется как маркер повреждения ГЭБ. Так, при хронической аккумуляции Аβ1-42 (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD) установлено значимое ($P=0,0250$) увеличение относительной площади ткани головного мозга, содержащей краситель Evans blue, ($19,78\pm 4,88$) в СА2 области гиппокампа по сравнению с контрольной группой ($3,01\pm 2,33$). Сходная картина наблюдалась и в СА1 области гиппокампа ($P=0,0330$). В то же время в СА3 области и зубчатой извилине гиппокампа у животных с генетической моделью БА не выявлено статистически значимого изменения ($P=0,1571$ и $P=0,1490$, соответственно).

Это свидетельствует о том, что увеличение проницаемости ГЭБ наиболее характерно для СА2 области гиппокампа, в меньшей степени – для СА1 области, и, весьма вероятно, для зубчатой извилины гиппокампа.

Экспрессия RAGE-белков, Аβ1-42 и Fe65 в эндотелии при хронической аккумуляции Аβ1-42 (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD)

Нами установлено, что хроническая аккумуляция Аβ1-42 вызывает статистически значимое повышение экспрессии RAGE в эндотелии гиппокампа головного мозга животных (мышей линии 5xFAD) ($18,08\pm 1,36\%$) по сравнению с контрольной группой ($8,73\pm 0,98\%$) ($P=0,0002$), что, по-видимому, может дополнительно способствовать транспорту Аβ1-42 в ткань головного мозга и аккумуляции его в гиппокампе.

Выявлено статистически значимое ($P<0,0001$) повышение экспрессии Аβ1-42 на эндотелии в гиппокампе головного мозга животных (мыши линии 5xFAD) ($16,62\pm 1,92\%$) по сравнению с контрольной группой ($4,57\pm 0,53\%$).

Хроническая аккумуляция Аβ1-42 вызывает повышение уровня экспрессии Fe65 в эндотелии гиппокампа ($30,00\pm 1,92\%$) по сравнению с контрольной группой ($23,36\pm 2,81\%$), однако разница не была статистически значимой ($P=0,0557$).

Увеличение в эндотелии гиппокампа экспрессии Аβ1-42 и адапторного для APP белка Fe65 при хронической аккумуляции Аβ1-42 (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD) в ткани головного мозга подразумевает возможность существования самостоятельных механизмов протеолиза APP в церебральном эндотелии, нарушающихся при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Оценка экспрессии RAGE в эндотелии церебральных микрососудов, маркера ангиогенеза (VEGFR2), белков плотных и адгезивных контактов церебрального эндотелия (JAM1 и ZO1) при остром токсическом действии Аβ1-42 *in vitro*

Двумя ключевыми кофакторами, которые способствуют развитию дисфункции церебральных сосудов при нейродегенерации альцгеймеровского типа, являются разрушение ГЭБ [Dickstein D. L., 2006] и нарушение мозгового кровообращения (гипоперфузия) [Zlokovic B. V., 2011]. Нарушение кровообращения

в головном мозге оказывает значимое влияние на проницаемость ГЭБ и концентрацию Аβ1-42.

Впервые показано, что влияние Аβ1-42 как в статической, так и закрытой динамической моделях ГЭБ *in vitro* вызвало однонаправленные изменения количества эндотелиальных клеток, экспрессирующих молекулы VEGFR2, JAM1 и ZO1, но не RAGE (Рисунок 7).

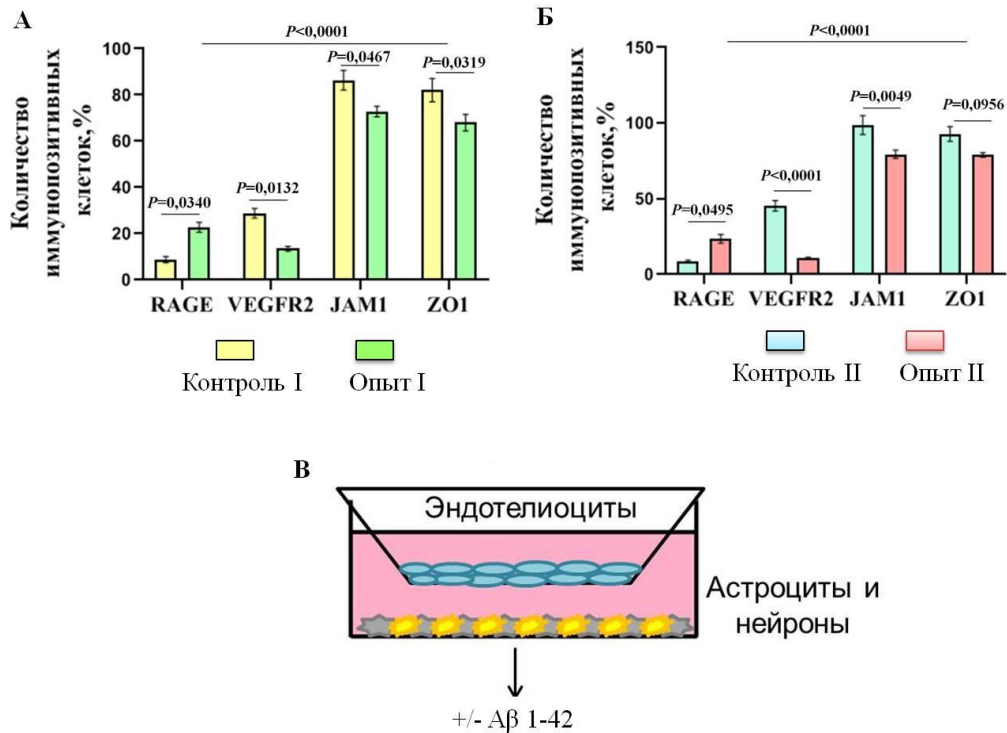


Рисунок 7 – Нарушение экспрессии RAGE, VEGFR2, JAM1 и ZO1 при остром токсическом действии Аβ1-42 *in vitro*: (А) в статической модели ГЭБ *in vitro*. Контрольная I – интактные эндотелиоциты, опытная I – эндотелиоциты, которые культивировались в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 (моделирование болезни Альцгеймера *in vitro*); (Б) в закрытой динамической модели ГЭБ *in vitro*. Контрольная II – интактные эндотелиоциты, опытная II – эндотелиоциты, которые культивировались в присутствии 10 мкМ Аβ 1-42 (моделирование болезни Альцгеймера *in vitro*); (В) блок-схема модели ГЭБ.

Нами установлено, что при остром токсическом действии Аβ1-42 *in vitro* (моделирование БА *in vitro*) наблюдается статистически значимое ($P < 0,05$) снижение величины трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) как в статической, так и открытой динамической моделях ГЭБ *in vitro* (Рисунок 8).

Таким образом, в условиях острого токсического действия Аβ1-42 *in vitro* в эндотелии подавляются процессы, связанные с рекрутингом (постоянное обновление пула клеток) клеток-предшественников и продукцией VEGFR2, увеличивается экспрессия RAGE рецепторов, ответственных за транспорт Аβ1-42 и развитие воспаления, выражено снижается величина ТЭС, что находит свое отражение в эндотелиальной дисфункции и увеличении проницаемости ГЭБ *in vivo*.

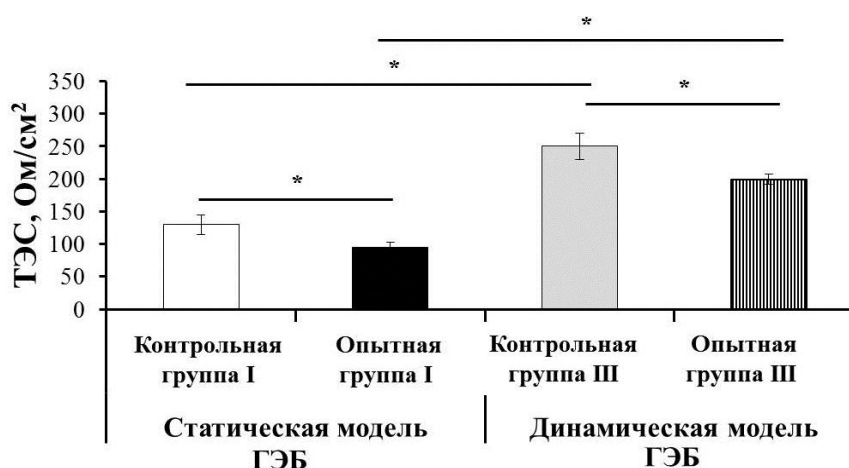


Рисунок 8 – Изменение ТЭС в статической и открытой динамической моделях ГЭБ *in vitro* в контрольных и опытных группах. Контрольная I – интактные эндотелиоциты, опытная I – эндотелиоциты, которые культивировались в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 (моделирование болезни Альцгеймера *in vitro*); контрольная III – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ; опытная III – эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ в присутствии 10 мкМ Аβ 1-42 (моделирование болезни Альцгеймера *in vitro*). * $P < 0,05$ – сравнение между группами, U-критерий Манна-Уитни.

Изменение ТЭС при модуляции RAGE в клетках эндотелия церебральных сосудов в составе динамической модели ГЭБ *in vitro*

Следующий блок исследований был посвящен изучению того, как модуляция экспрессии RAGE в качестве молекулы, маркирующей развитие церебральной амилоидной ангиопатии, как это было установлено нами, влияет на состояние ГЭБ *in vitro*, в том числе при эндотелиотоксическом действии Аβ1-42.

Ингибирование экспрессии RAGE в контрольной группе III (интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ) привело к статистически значимому повешению величины ТЭС в первые часы эксперимента, с последующим ее снижением к концу суток. При культивировании эндотелиальных клеток в присутствии Аβ1-42 (лиганда RAGE) нами не выявлено статистически значимого его влияния на величину ТЭС (Рисунок 9А). В то же время в условиях острого токсического действия Аβ1-42 *in vitro* (моделирование БА *in vitro*), нами установлено, что ингибирование экспрессии RAGE вызывает более стойкое и длительное увеличение величины ТЭС, тогда как добавление лиганда RAGE – Аβ1-42 приводит к снижению величины ТЭС к концу 24 ч после его внесения в культуру клеток (Рисунок 9Б).

Таким образом, при реализации эндотелиотоксического влияния Аβ1-42 в модели БА *in vitro*, блокирование экспрессии RAGE приводит к выраженному повышению величины ТЭС в динамической модели ГЭБ *in vitro*. Аналогичный эффект наблюдается и в контрольной группе интактных эндотелиоцитах с подавленной экспрессией RAGE.

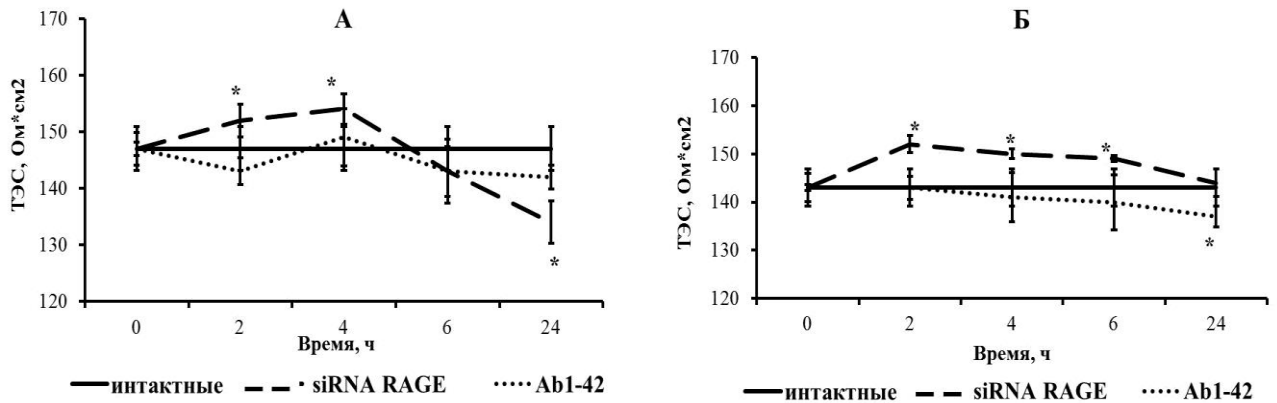


Рисунок 9 – Влияние модуляторов RAGE на величину ТЭС в открытой динамической модели ГЭБ *in vitro*. (А) в контрольной группе III (интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ); (Б) в опытной группе III (эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ в присутствии 10 мкМ Аβ 1-42 (моделирование болезни Альцгеймера *in vitro*). * $P < 0,05$ – сравнение между группами, U-критерий Манна-Уитни.

Особенности проницаемости эндотелиальных клеток ГЭБ для высокомолекулярных соединений *in vitro* при модуляции RAGE

При изучении проницаемости клеток эндотелия ГЭБ в группе, в которой клетки были выделены от ложно-оперированных животных модуляция RAGE показала, что добавление siRNA RAGE, а также культивирование в присутствии Аβ1-42 привело к повышению проницаемости эндотелиоцитов для FITC-декстрана (Рисунок 10А). В группе, в которой клетки, которые были выделены от животных с инъекционной моделью БА модуляция RAGE показала, что использование siRNA RAGE, а также добавление в культуру клеток Аβ1-42 приводит к повышению проницаемости эндотелиоцитов для FITC-декстрана. При этом влияние модуляторов на проницаемость ГЭБ в группе животных с инъекционной моделью БА оказалось более выраженным по сравнению с ложно-оперированными (Рисунок 10Б).

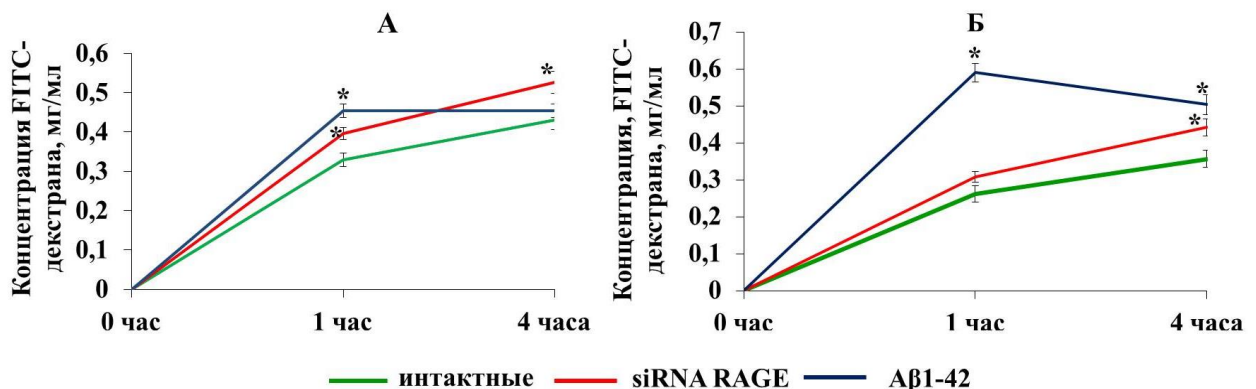


Рисунок 10 – Изменение проницаемости эндотелиоцитов для FITC-декстрана при воздействии модуляторов RAGE (siRNA RAGE и Аβ 1-42) в норме и при болезни Альцгеймера. (А) эндотелиоциты, которые выделены от ложно-оперированных животных: интактные – культура эндотелиоцитов без воздействия химических модуляторов и siRNA, siRNA RAGE – эндотелиоциты после добавления siRNA RAGE, Аβ1-42 – эндотелиоциты после добавления лиганда RAGE – Аβ1-42; (Б) эндотелиоциты, которые выделены от животных с инъекционной моделью БА. * $P < 0,05$ – сравнение с интактной группой, U-критерий Манна-Уитни.

Таким образом, при моделировании БА *in vitro* нами установлено, что блокирование экспрессии RAGE приводит к повышению проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений (FITC-декстрана). Аналогичный эффект наблюдается и у ложно-оперированных животных, однако в меньшей степени.

Особенности ангиогенеза при RAGE-модуляции в эндотелиальных клетках церебральных сосудов в составе модели ГЭБ *in vitro*

Для исследования ангиогенеза при RAGE-модуляции мы провели регистрацию маркера ангиогенеза – рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2) на клетках церебрального эндотелия, выделенных от животных с инъекционной моделью БА и ложно-оперированных животных.

В группе животных с инъекционной моделью БА, при модуляции RAGE, было установлено значимое ($P < 0,0001$) снижение количества эндотелиоцитов, экспрессирующих VEGFR2, как и после добавления siRNA RAGE, так и при культивировании в присутствии A β 1-42 (лиганда RAGE) по сравнению с группой с ложной операцией. Однако экспрессия VEGFR2 эндотелиоцитами без воздействия химических модуляторов и siRNA RAGE значимо ($P = 0,0037$) увеличивалась по сравнению с ложно-оперированными животными.

Таким образом, весьма интересным является то, что на фоне ингибирования экспрессии RAGE в церебральном эндотелии, выделенном от ложно-оперированных животных, существенно увеличивалось количество VEGFR2-иммунопозитивных клеток. Аналогичный эффект наблюдался и при краткосрочном действии лиганда RAGE – A β 1-42 *in vitro*. При моделировании болезни Альцгеймера *in vitro* такие эффекты существенно подавляются, однако в нашем случае исходный уровень экспрессии эндотелиальных клеток с VEGFR2 (без добавления химических модуляторов и siRNA RAGE) значимо выше по сравнению с уровнем экспрессии эндотелиальных клеток с VEGFR2, выделенных от ложно-оперированных животных.

Аккумуляция γ H2AX в нейронах гиппокампа при остром токсическом действии A β 1-42 (инъекционная модель БА) и его хронической аккумуляции (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD)

Установлено, что в условиях острого токсического действия A β 1-42 статистически значимо повышается уровень γ H2AX на нейронах в гиппокампа ($10,50 \pm 1,29\%$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($6,87 \pm 1,21\%$) при $P = 0,0443$.

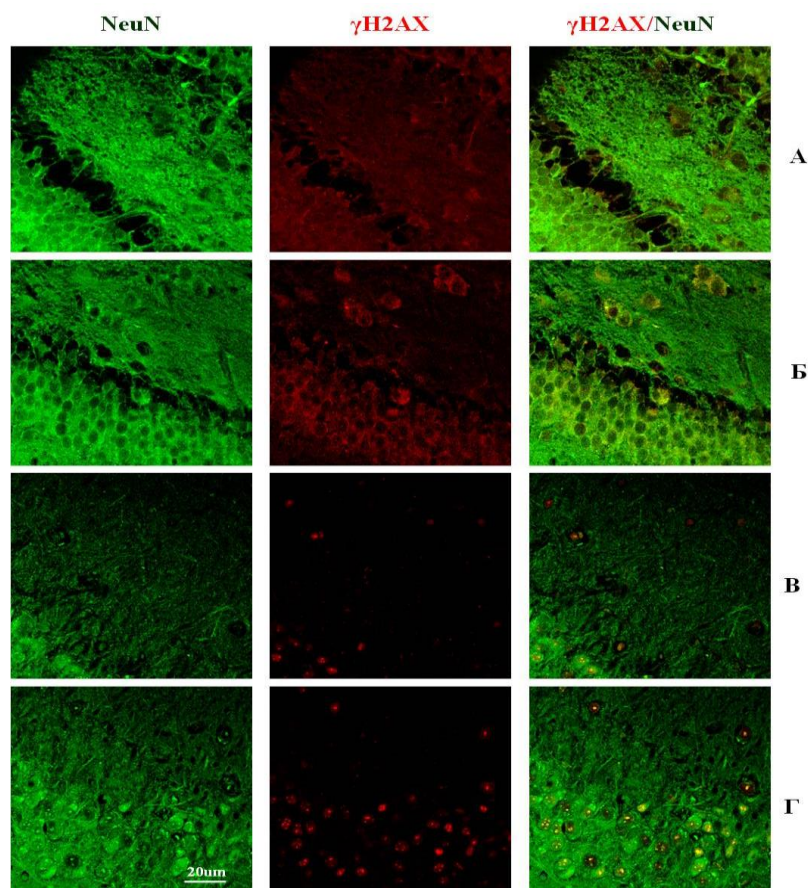


Рисунок 11 – Иммуногистохимический анализ экспрессии γ H2AX на нейронах в гиппокампе головного мозга животных разных экспериментальных групп

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия γ H2AX +клеток (красный), NeuN+клеток (зеленый) в гиппокампе головного мозга в экспериментальных группах: (А) ложно-оперированные животные, (Б) животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера, (В) контрольная группа (линия C57BL/6), (Г) животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (мыши линии 5xFAD).

Примечательно, что животные с генетической моделью БА демонстрируют максимальную аккумуляцию γ H2AX в нейронах гиппокампа ($(28,33 \pm 1,77\%)$) против ($9,27 \pm 0,92\%$) у ложно-оперированных ($P < 0,001$) (Рисунок 11).

Таким образом, в условиях острого нейротоксического действия A β 1-42 и при его хронической аккумуляции в ткани головного мозга наблюдается выраженное накопление γ H2AX в нейронах гиппокампа, что свидетельствует о формировании двуцепочечных разрывов ДНК и, как следствие, прогрессирующем повреждении нервных клеток.

Особенности синаптической передачи в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга в норме и в условиях острого токсического действия A β 1-42 (инъекционная модель БА)

Поскольку двуцепочечные разрывы ДНК также могут вызывать изменения транскрипции промоторов генов, расположенных рядом с сайтами разрыва [Iannelli F., 2017], тем самым приводя к изменениям синаптической пластичности, мы изучили влияния острого токсического действия A β 1-42 и инсулина на

синаптическую передачу в норме и при болезни Альцгеймера (инъекционная модель) в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга.

В ходе исследования влияния острого токсического действия Аβ1-42 на синаптическую передачу в гиппокампе головного мозга у животных с инъекционной моделью БА выявлено нарушение электрических свойств пирамидных нейронов гиппокампа СА3 области, о чем указывало значимое ($P=0,0037$) увеличение времени спада амплитуд полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП) и тенденция ($P=0,0694$) к увеличению времени нарастания амплитуд пВПСП по сравнению с ложно-оперированными животными, что может отражать замедленное высвобождение нейромедиатора из пресинапса. Кроме того, наблюдалось нарушение возбудимости нервных клеток СА3 области гиппокампа в виде значимого ($P=0,0159$) уменьшения амплитуды пВПСП (Таблица 1).

Таблица 1 – Основные нейрофизиологические характеристики пВПСП СА3 области гиппокампа в норме и при остром токсическом действии бета-амилоида 1-42

Группы животных	Электрофизиологические характеристики		
	Время нарастания амплитуды пВПСП, мсек	Время спада амплитуды пВПСП, мсек	Амплитуда, мВ
Ложная операция	0,56±0,02	1,76±0,04	0,48±0,04
Инъекционная модель БА	0,68±0,06	2,46±0,28	0,35±0,02
<i>P</i> (U-критерий Манна-Уитни)	0,0694	0,0037	0,0159

В нейронах базо-латерального комплекса миндалевидного тела наблюдалось более выраженное влияние на синаптическую передачу острого токсического действия Аβ1-42 в виде изменения всех исследуемых электрофизиологических показателей. Интересен тот факт, что действие Аβ1-42 на мышей с инъекционной моделью БА обладает нейропротективным эффектом, а именно, происходило статистически значимое ($P=0,0088$) увеличение амплитуд пВПСП нейронов миндалевидного тела (0,88±0,07 против 0,59±0,06 группы с ложной операцией) на фоне значимого снижения времени нарастания (0,69±0,03 против 0,99±0,05 группы с ложной операцией при $P=0,0010$) и времени спада амплитуд пВПСП (1,48±0,13 против 3,28 группы с ложной операцией при $P=0,0030$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о нарушении синаптической передачи нейронов в СА3 области гиппокампа в условиях острого токсического действия Аβ1-42, что может быть связано с уменьшением возбудимости нейронов СА3 области гиппокампа и замедленным высвобождением нейромедиатора из пресинапса в синаптическую щель. Неожиданным образом, Аβ1-42 оказывал позитивный эффект на синаптическую передачу нейронов базо-латерального комплекса миндалевидного тела в виде увеличения возбудимости и ускорения высвобождения нейромедиатора в синаптическую щель в синапсах.

Далее мы изучили влияние инсулина на синаптическую передачу в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга в норме и в условиях острого токсического действия Аβ1-42 (инъекционная модель БА).

Для оценки эффектов инсулина на нейроны головного мозга мы проводили однократную острую аппликацию 500нМ раствора инсулина непосредственно в ванночку с живым срезом головного мозга. Динамика изменения электрофизиологической активности оценивалась в нескольких временных точках по увеличению или уменьшению амплитуд пВПСП.

У ложно-оперированных животных была выявлена различная чувствительность нейронов к инсулину в разных отделах головного мозга (Рисунок 12).

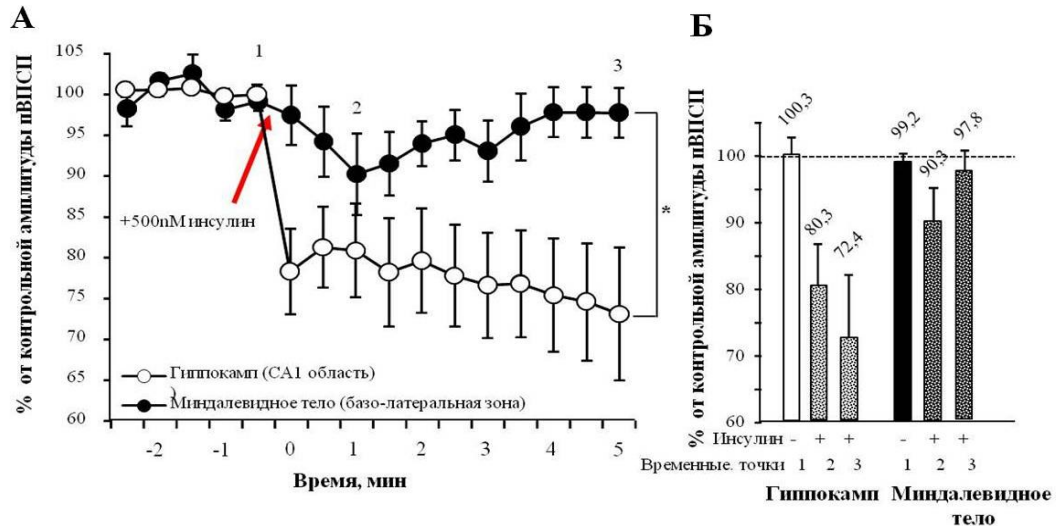


Рисунок 12 – Влияние инсулина на нейроны CA1 области гиппокампа и базо-латеральной зоны миндалевидного тела в норме при его острой аппликации в концентрации 500 нМ на живой срез

(А) Сводный график усреднённых амплитуд. Время однократного введения 500 нМ инсулина показано красной стрелкой. (Б) Сводная диаграмма усреднённых амплитуд пВПСП нейронов CA1 области гиппокампа и базо-латеральной зоны миндалевидного тела, полученных от ложно-оперированных животных, во временных точках 1, 2 и 3 (см. график А).

В частности, пирамидные нейроны CA1 области гиппокампа реагировали значительным снижением амплитуд пВПСП непосредственно после введения 500нМ инсулина, по сравнению с нейронами базо-латерального комплекса миндалевидного тела на 5-й мин исследования (Рисунок 12).

Эффект инсулина на нейроны CA1 области гиппокампа имел тенденцию к уменьшению амплитуд пВПСП в течение 5 мин, тогда как максимальный эффект в нейронах миндалевидного тела наблюдался спустя 1 мин аппликации с последующим нивелированием этого эффекта (80,3±5,8% и 90,3±5,0%, соответственно, в точке 2 и 72,8±8,2% и 97,8±3,1%, соответственно, в точке 3) (Рисунок 12).

Исследование эффектов инсулина на нейроны базо-латеральной зоны миндалевидного тела проходило более детально – с созданием инъекционной модели БА (моделирование острого токсического действия Aβ1-42). Учитывая маловыраженное влияние на синаптическую передачу нейронов миндалевидного тела, был применён метод линейной регрессии для выявления статистически значимого влияния инсулина (Рисунок 13 В).

Наиболее выраженные изменения наблюдались у ложно-оперированных животных. При добавлении 500 нМ инсулина наблюдалась динамика снижения амплитуды пВПСП в точке 2 и 3 ($97,51 \pm 3,72\%$ и $90,31 \pm 5,04\%$, соответственно). При этом у животных с инъекционной моделью БА изменения амплитуды пВПСП носили разнонаправленный характер (Рисунок 13 А-Б).

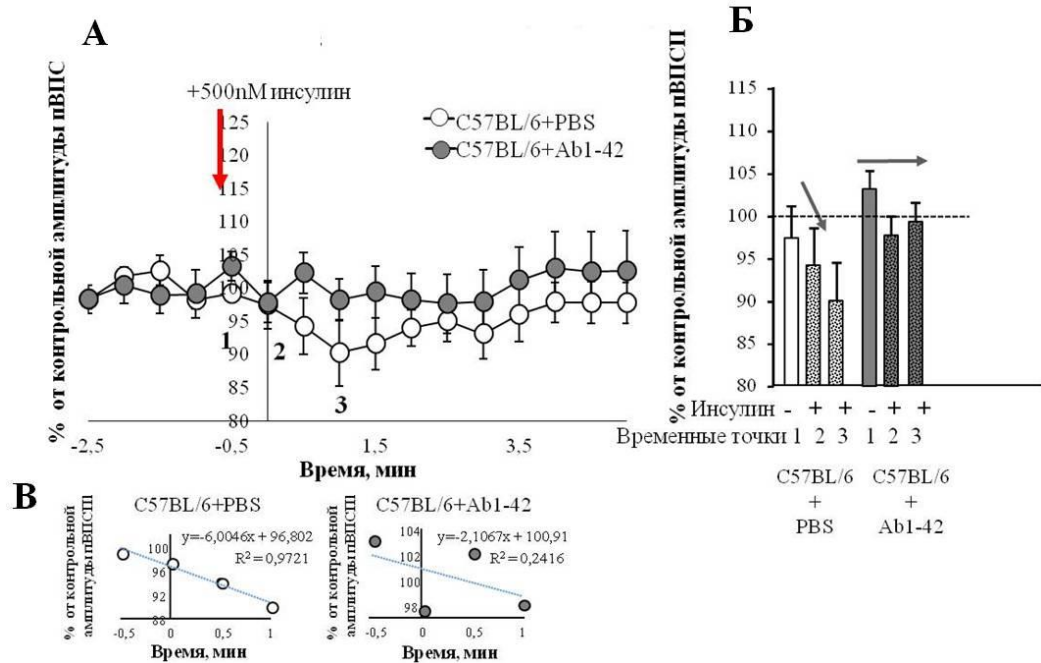


Рисунок 13 – Нарушение действия инсулина в виде изменения синаптической передачи в нейронах базо-латеральной зоны миндалевидного тела при остром токсическом действии Аβ1-42

(А) Сводный график усреднённых амплитуд. Время однократного введения 500 нМ инсулина показано красной стрелкой. (Б) Сводная диаграмма усреднённых амплитуд пВПСП нейронов базо-латеральной зоны миндалевидного тела, полученных от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS), во временных точках 1, 2 и 3 (см. график А). Стрелками показана динамика изменения амплитуд пВПСП в ответ на введение 500нМ инсулина. Статистически значимое нарастание или уменьшение амплитуд пВПСП, найденное с помощью метода линейной регрессии, показаны в виде стрелок, имеющих тупой угол относительно горизонтальной плоскости. Статистически незначимое изменение амплитуд пВПСП представлено в виде стрелок параллельных горизонтальной плоскости. (В) Стандартные линии регрессии, отражающие динамику нормированных амплитуд пВПСП в ответ на введение 500нМ инсулина, построенные по точкам амплитуд пВПСП. Каждая точка содержит среднее значение пВПСП за полминуты. Показаны уравнения прямых и коэффициенты регрессии.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что в физиологических условиях (у ложно-оперированных животных) действие инсулина проявляется уменьшением возбудимости нейронов в виде сокращения пВПСП. Тогда как в условиях острого токсического действия Аβ1-42 нарушает этот паттерн, нивелируя эффекты инсулина.

Синаптическая пластичность считается нейронной основой процесса обучения и памяти [Shankar G. M., 2008]. Нами установлено, что у мышей с инъекционной моделью БА на протяжении всего периода тестирования «Fear conditioning» не формировался условный рефлекс (замирание) на неприятный стимул, что указывало

о нарушение обучения и формировании памяти страха в условиях острого токсического действия $A\beta 1-42$ (Рисунок 14).

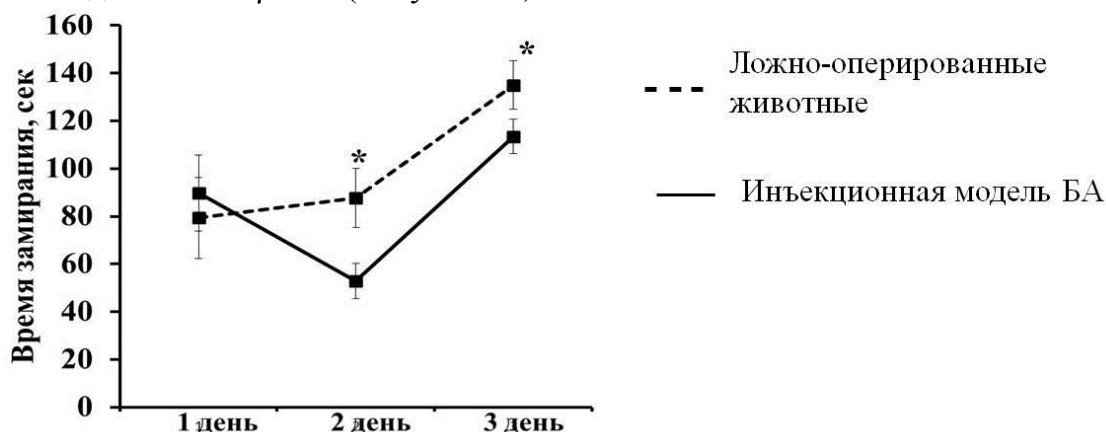


Рисунок 14 – Поведение животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера и ложно-оперированных животных в тесте «Fear conditioning». * $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенности экспрессии и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-опосредованных сигнальных путей и инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера

При развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа (в условиях острого токсического действия $A\beta 1-42$ – инъекционная модель заболевания) происходит увеличение экспрессии гена *insulin I* как в гиппокампе, так и миндалевидном теле, что можно рассматривать как компенсаторный механизм в ответ на токсическое действие $A\beta 1-42$, а также его конкурентное связывание с рецептором инсулина. Это сопровождается снижением экспрессии в нейронах гиппокампа *IR* и *IRS1* и снижением в нейронах миндалевидного тела *IRS1*. Дисрегуляция рецептора инсулина и его субстрата способствует активации цепи патологических реакций вниз по двум инсулин-сигнальным путям – MAPK-пути (снижение экспрессии в нейронах MAPK (*ERK1/2*)) и PI3K-пути (снижение экспрессии в нейронах как *GSK-3 beta*, так и PKC – одной из мишеней Akt-киназы, активация которой инсулином способствует транслокации GLUT4 в плазматическую мембрану), а также уменьшению экспрессии в нейронах инсулин-регулируемой аминопептидазы *IRAP*. В нейронах снижение уровня *IRAP/GLUT4* вызывает гиперполяризацию мембраны митохондрий, что может указывать о нарушении митохондриального окислительного метаболизма в клетках головного мозга, индуцированного нейротоксическим эффектом $A\beta 1-42$. Это сопровождается повышением уровня лактата в ткани головного мозга, что может быть объяснено усилением поглощения глюкозы неповрежденными нейрональными клетками в качестве защитного механизма от нейротоксического действия бета-амилоида. Также возможно, что в условиях выявленного нами нарушения передачи сигналов инсулина по PI3K-сигнальному пути в нейронах, вызывающего дисметаболизм глюкозы, с последующим ингибированием транслокации глюкозных транспортеров, в нашем случае, GLUT4, происходит компенсаторная активация метаболизма глюкозы в

астроцитах и перенос лактата монокарбоксилатными транспортерами к нейронам [Riske L., 2017], что позволит нейронам использовать лактат в качестве альтернативного энергетического субстрата в условиях, не способствующих аэробному метаболизму.

Хроническая аккумуляция Аβ1-42 (генетическая модель БА - мыши линии 5xFAD) вызывает снижение в нейронах миндалевидного тела экспрессии IRS1, что сопровождается нарушением передачи сигналов вниз по двум инсулин-сигнальным путям – MAPK-пути (снижение экспрессии в нейронах MAPK (ERK1/2)) и PI3K-пути (снижение экспрессии в нейронах GSK-3beta и PKC), а также уменьшением уровня экспрессии инсулин-регулируемой аминопептидазы IRAP.

Дисбаланс энергетического метаболизма индуцирует окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию, приводя к образованию активных форм кислорода и активных формы азота, которые повреждают РНК, ДНК, белки и др. [Hoyer S., 2000; Kolosova N.G. 2006], способствуя прогрессированию нейродегенеративного заболевания. В совокупности, полученные данные указывают о развитии инсулинорезистентности в миндалевидном теле, которое находится во взаимосвязи с гиппокампом при осуществлении когнитивных функций и процессов обучения и запоминания, связанных с эмоционально окрашенными событиями [Chai S. Y., 2008].

Нарушение нейропластичности и синаптической передачи в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

Нарушение передачи сигналов инсулина в головном мозге, наблюдаемое при БА, вызывает развитие нарушений церебрального метаболизма глюкозы, которая является ключевым источником энергии для нервных клеток при реализации ими различных функций, в частности, биосинтеза нейротрансмиттеров [Dienel G. A., 2012], поддержании ионных градиентов и потенциала покоя нейронов, генерации потенциалов действия и постсинаптических потенциалов [Howarth C., 2012].

Поддержание целостности генома имеет важное значение для нормальной экспрессии генов и функционирования клеток. Показано, что повышение уровня поврежденного ДНК в стареющем мозге связаны со снижением экспрессии основных генов, в том числе генов, участвующих в пластичности нейронов [Lu T., 2004]. Повреждение ДНК нейронов дополнительно усугубляется при БА [Madabhushi R., 2014], что может способствовать обширным негативным изменениям в экспрессии генов и потере нейронов.

Нами установлено, что развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа в условиях острого токсического действия Аβ1-42 (инъекционная модель БА) сопровождается патологическим изменением экспрессии ключевых молекул-компонентов инсулин-сигнального пути, что ассоциировано с развитием церебрального дисметаболизма глюкозы. Это находит свое отражение в нейрональной аккумуляции маркера двуцепочечных разрывов ДНК – γH2AX, что вероятно, связано с проявлением токсического эффекта Аβ1-42, тем самым приводя к дезактивации нейронов.

Это обуславливает возникновение и развитие аберрантной синаптической передачи нейронов гиппокампа за счет уменьшения возбудимости нейронов и замедленным высвобождением нейромедиатора из пресинапса в синаптическую щель. При этом интересен тот факт, что при интрагиппокампальном введении Аβ1-42 животным, он оказал положительное влияние на синаптическую передачу нейронов миндалевидного тела, что проявилось в виде увеличения возбудимости и ускорения высвобождения нейромедиатора в синаптическую щель в синапсах.

Важно отметить установленное нами различие в чувствительности нейронов к инсулину в гиппокампе и миндалевидном теле. При этом в физиологических условиях эффект инсулина на нейроны миндалевидного тела проявлялся снижением возбудимости нейронов в виде сокращения амплитуды пВПСП, тогда как в условиях острого токсического действия бета-амилоида 1-42 (инъекционная модель БА) влияние инсулина полностью нивелировалось под воздействием бета-амилоида 1-42.

На основании проведенных электрофизиологических исследований можно заключить, что в основе нормальной синаптической передачи нервного импульса и синаптической пластичности в нейронах гиппокампа и миндалевидного тела лежит регуляция уровня экспрессии лиганд-зависимых и метаболитных рецепторов, как на пре-, так и на постсинаптической мембране. Эти процессы модулируются Аβ1-42. При этом эффекты Аβ1-42, введенного в СА1 область гиппокампа, распространяются на соседние зоны головного мозга и вызывают нарушение механизмов передачи нервного импульса. Патологические изменения инсулин-зависимой синаптической пластичности происходят посредством нарушения функции инсулиновых рецепторов (развитие локальной инсулинорезистентности), что в конечном итоге негативно отражается на процессах ассоциативного обучения и эмоциональной памяти.

Особенности изменения проницаемости ГЭБ, церебрального ангиогенеза и микроциркуляции при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью

Передача сигналов инсулина оказывает прямое влияние на тонус и функцию сосудов. Кровеносные сосуды регулируют артериальное давление и перфузию в тканях по всему телу за счет выработки вазоактивных веществ в ответ на различные вазоактивные гормоны (например, инсулин, маркеры ренин-ангиотензина) и нервные импульсы. Известно, что инсулин оказывает прямое действие на микрососудистые сегменты артериальной сосудистой сети [Iadecola C., 2004].

Как известно, эндотелий церебральных сосудов экспрессирует рецепторы инсулина – IR. Инсулин, взаимодействуя с рецепторами инсулина, воздействует на артериальную сосудистую сеть, регулируя функцию сосудов за счет баланса вазодилатации и вазоконстрикции. В физиологических условиях вазодилатация реализуется за счет увеличения продукции и биодоступности оксида азота через PI3K/Akt/ эндотелиальной NO-синтазный путь; вазоконстрикция за счет эндотелина-1 через MAPK-путь [Muniyappa R., 2013]. Инсулин регулирует тонус сосудов, уравновешивая эти два сигнальных пути.

Десенсбилизация инсулина в ткани головного мозга при развитии БА вызывает нарушение передачи сигналов инсулина, что приводит к гибели нейронов и активации глии. Это индуцирует повышение уровня активных форм кислорода, развитие окислительного стресса и дисфункции митохондрий, что в комплексе приводит к дегенерации ГЭБ и притоку лейкоцитов. При поврежденном ГЭБ, который утрачивает способность к избирательной проницаемости и клиренсу, активная генерация бета-амилоида в ткани головного мозга приводит к его отложению в паренхиме и кровеносных сосудах [Bell R. D., 2009; Sagare A. P., 2012], что, в конечном итоге, способствует развитию церебральной амилоидной ангиопатии [Kawai M., 1993].

Такой акцент на сосудистых факторах весьма оправдан, поскольку хроническая гипергликемия, гиперинсулинемия, окислительный стресс, накопление конечных продуктов гликирования и воспаление в совокупности способствуют развитию церебральных сосудистых нарушений при развитии БА, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью.

Нами установлено, что нейродегенерация альцгеймеровского типа в условиях хронической аккумуляции $A\beta 1-42$ в ткани головного мозга (генетическая модель БА) сопровождается нарушением передачи сигналов инсулина по PI3K-инсулин-сигнальному пути, что приводит в эндотелии гиппокампа к гиперэкспрессии адапторного для APP белка Fe65 и накоплению $A\beta 1-42$. Это может быть обусловлено нарушением протеолиза APP в церебральном эндотелии из-за неспособности инсулина через PI3K-сигнальный путь дефосфорилировать APP и тем самым ингибировать взаимодействие с белковым комплексом Fe65, который активизирует образование и отложение $A\beta 1-42$.

В условиях хронической аккумуляции $A\beta 1-42$ (генетическая модель БА) выше указанные патологические события сопряжены с подавлением неоангиогенеза за счет снижения экспрессии CD31 в гиппокампе, а также выраженными церебральными микрососудистыми нарушениями (процесс ремоделирования микрососудистого русла, которые имеет разнонаправленный характер – в СА1 области и зубчатой извилине протекает неоангиогенез, тогда как в СА2 и СА3 областях наблюдаются локальные нарушения микроциркуляции из-за сокращения диаметра и разветвленности сосудов. Это в совокупности вызывает повышение проницаемости ГЭБ.

Кроме того, при хронической аккумуляции $A\beta 1-42$ (генетическая модель БА) выявленное нами нарушение передачи сигналов инсулина по PI3K-пути, а именно, снижение уровня экспрессии PKC (мишень для Akt-киназы, активация которой инсулином способствует транслокации GLUT4 в плазматическую мембрану и), приводит к нарушению церебрального метаболизма глюкозы, что в свою очередь вызывает гиперэкспрессию рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE на эндотелии в гиппокампе. Это индуцирует отложение $A\beta 1-42$ в эндотелии церебральных микрососудов *in vivo*, что в конечном итоге вызывает церебральные сосудистые нарушения, наблюдаемые при развитии БА.

Моделирование БА *in vitro* (острое токсическое действие $A\beta 1-42$ *in vitro*) сопровождается нарушением в эндотелии церебральных микрососудов экспрессии

VEGFR2 (что может отражать несовершенный ангиогенез, выявленный нами *in vivo*), увеличением уровня экспрессии RAGE (что соответствует результатам, полученным *in vivo*), принимающего участие в транспорте A β 1-42 и развитии воспаления. Это вызывает развитие эндотелиальной дисфункции, и повышение проницаемости ГЭБ, что характерно для развития церебральной амилоидной ангиопатии. При этом блокирование экспрессии RAGE приводит к повышению величины ТЭС, что в свою очередь препятствует развитию патологической проницаемости ГЭБ *in vitro*. Важно и то, что блокирование экспрессии RAGE как инструмент управления проницаемостью ГЭБ для высокомолекулярных соединений наиболее эффективно себя проявил именно при моделировании БА *in vitro* на фоне развития церебральной амилоидной ангиопатии.

Интересным является и выявленный нами факт – на фоне подавления экспрессии RAGE в церебральной эндотелии, выделенном от ложно-оперированных животных, существенно возрастает количество VEGFR2-иммунопозитивных клеток. Подобный эффект наблюдается при краткосрочном действии лиганда RAGE – A β 1-42 *in vitro*. Это может указывать о супрессивном влиянии RAGE на процессы ангиогенеза. В то же время при моделировании БА *in vitro* блокирование экспрессии RAGE, а также добавление лиганда не приводит к реализации данного эффекта. При этом исходный уровень экспрессии в эндотелии VEGFR2 значимо выше, чем в эндотелии, выделенном от ложно-оперированных животных, что подтверждает наши наблюдения *in vivo* по стимуляции ангиогенеза при экспериментальной БА.

Указанные церебральные сосудистые нарушения, наблюдаемые при БА *in vivo* и *in vitro*, регистрируются на фоне развития локальной инсулинорезистентности, что может свидетельствовать о дисметаболизме глюкозы в аффектированных регионах головного мозга, провоцируя гиперэкспрессию рецептора конечных продуктов гликирования RAGE на эндотелии, что в свою очередь активирует транспорт и накопление A β 1-42 в эндотелии церебральных микрососудов, вызывая развитие церебральной амилоидной ангиопатии.

Таким образом, как острое токсическое действие A β 1-42, так и его хроническая аккумуляция, вызывают развитие нарушения передачи сигналов инсулина в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга, тем самым запуская каскад реакций, приводящих к интенсификации процессов образования и накопления A β 1-42 в ткани головного мозга, что в итоге замыкает «порочный круг патогенеза» (Рисунок 15).

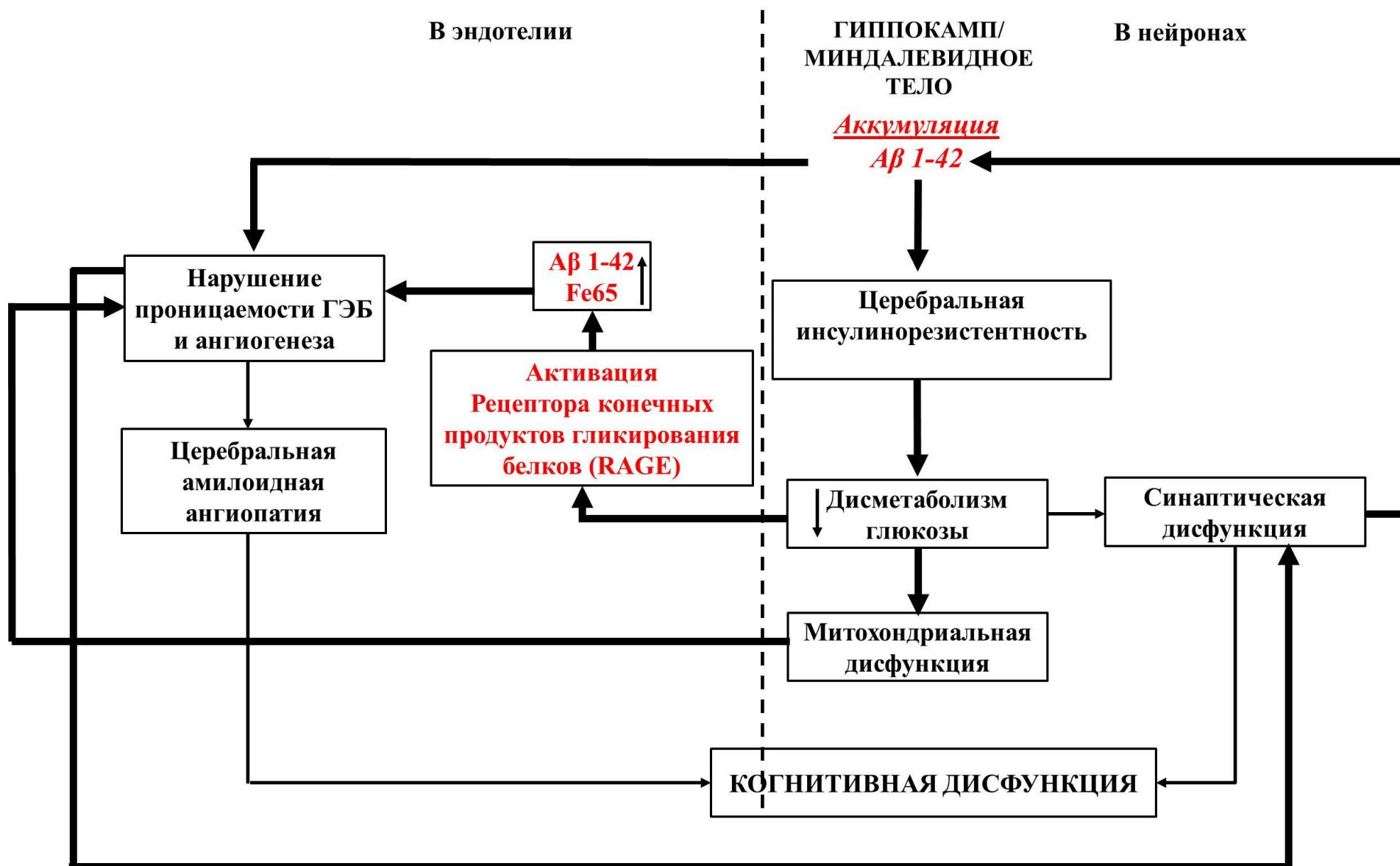


Рисунок 15 – Схема патогенеза нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью

ВЫВОДЫ

1. При остром токсическом действии А β 1-42 *in vivo* происходит формирование инсулинорезистентности, проявляющееся в увеличении уровня экспрессии гена *insulin I* в гиппокампе и миндалевидном теле (в 4 и 7 раз соответственно), что сопровождается снижением в нейронах экспрессии инсулинового рецептора (IR), субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1) (в 1,5 и 2,5 раза соответственно), уменьшением экспрессии протеинкиназы C (в 1,5 раза), увеличением экспрессии гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3 β) (в 5 раз), уменьшением экспрессии митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) (в 2,5 раза) и инсулин-регулируемой аминопептидазы IRAP (в 2 раза). В нейронах снижение уровня IRAP/GLUT4 приводит к повышению трансмембранного митохондриального потенциала (в 1,5 раза) и увеличению уровня лактата в ткани головного мозга.

2. В нейронах миндалевидного тела хроническая аккумуляция А β 1-42 (мыши линии 5xFAD) вызывает развитие инсулинорезистентности за счет уменьшения экспрессии субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1) (в 1,5 и 1,3 раза соответственно), что сопровождается снижением экспрессии протеинкиназы C (в 1,5 раза), увеличением экспрессии гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3 β) (в 3 раза), уменьшением экспрессии митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) (в 2,5 раза) и инсулин-регулируемой аминопептидазы IRAP (в 2 раза).

3. Острое токсическое действие А β 1-42 и его хроническая аккумуляция приводят к нарушению структурной целостности ГЭБ, что проявляется в эндотелии гиппокампа повышением экспрессии Fe65 (в 1,5 раза) и накоплением А β 1-42 (увеличение уровня в 2 и 3,5 раза, соответственно). В эндотелиальных клетках гиппокампа у мышей линии 5xFAD хроническая аккумуляция А β 1-42 вызывает увеличение экспрессии рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE (в 2 раза), снижение экспрессии маркера эндотелиоцитов CD31 в гиппокампе, а также сокращение среднего диаметра микрососудов, уменьшение количества ветвлений сосудистой сети в СА2 и СА3 зонах гиппокампа, повышение проницаемости ГЭБ в СА1 и СА2 зонах гиппокампа.

4. Острое токсическое действие А β 1-42 *in vitro* вызывает нарушение структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера, что сопровождается в эндотелии церебральных микрососудов снижением экспрессии рецептора 2 эндотелиального фактора роста сосудов VEGFR2 (в 2 раза), белков плотных и адгезивных контактов JAM1 и ZO1 (в 1,5 раза), увеличением экспрессии рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE (в 2 раза). Подавление в церебральном эндотелии экспрессии RAGE частично предотвращает развитие патологической проницаемости гематоэнцефалического барьера.

5. В нейронах гиппокампа острое токсическое действие А β 1-42 *in vivo* вызывает накопление γ H2AX – маркера двуцепочечных разрывов ДНК (увеличение уровня в 3 раза), патологические изменения синаптической трансдукции в СА3 области гиппокампа, нарушение инсулин-опосредованных механизмов регуляции синаптической передачи в нейронах базо-латеральной зоны миндалевидного тела головного мозга, что соответствует разной чувствительности этих двух регионов головного мозга к токсическому действию А β 1-42 и находит свое отражение в нарушении процессов ассоциативного обучения и эмоциональной памяти.

6. В патогенезе нейродегенерации альцгеймеровского типа в результате острого токсического действия А β 1-42 или его хронической аккумуляции нарушение

инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках нейрональной природы связано с нарушением экспрессии рецепторов инсулина, IRS1 и активируемых ими сигнальных молекул по MAPK-пути (ERK1/2) и PI3K-пути (GSK-3 β , PKC). Дисрегуляция PKC вызывает нарушение экспрессии IRAP/GLUT4, и церебральный дисметаболизм глюкозы, что сопряжено с нейрональной аккумуляцией γ H2AX, нарушением экспрессии в церебральном эндотелии молекул, участвующих в реализации биологических эффектов A β 1-42 (Fe65, RAGE), а также молекул-регуляторов проницаемости ГЭБ или неангиогенеза (JAM1, ZO1, VEGF2), что в конечном итоге приводит к формированию aberrантной нейропластичности, когнитивному дефициту и амилоидной ангиопатии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Нейровоспаление и инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Салмина А.Б., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Федюкович Л.В., Успенская Ю.А., Морозова Г.А., Демко И.В., Петрова М.М. // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2014. - №4. - С.11-19. (Перечень ВАК РФ).
2. Воспаление и старение мозга / Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Кувачева Н.В., Лопатина О.Л., Пожиленкова Е.А., Горина Я.В., Гасымлы Э.Д., Панина Ю.А., Моргун А.В., Малиновская Н.А.// **Вестник Российской академии медицинских наук**. - 2015. - №1. - С.17-25. (Перечень ВАК РФ).
3. Современные представления о патогенезе болезни Альцгеймера: новые подходы к фармакотерапии (обзор) / Комлева Ю.К., Кувачева Н.В., Лопатина О.Л., Горина Я.В., Фролова О.В., Тепляшина Е.А., Петрова М.М., Салмина А.Б. // **Современные технологии в медицине**. - 2015. - Т.7, №3. - С.138-148. (Перечень ВАК РФ).
4. H2S- and NO-signaling pathways in Alzheimer amyloid vasculopathy: synergism or antagonism? / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Szijarto I.A., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Gertsog G.E., Filipovic M.R., Gollasch M. // **Frontiers in Physiology**. - 2015. - №6. - P.361-365. (Scopus).
5. Astroglial control of neuroinflammation: TLR3-mediated dsRNA-sensing pathways are in the focus / Salmina A.B., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Kuvacheva N.V., Gorina Ya.V., Panina Yu.A., Uspenskaya Yu.A., Petrova M.M., Demko I.V., Zamay A.S., Malinovskaya N.A. // **Reviews in the Neurosciences**. - 2015. - Vol.26, №2. - P.143-159. (Scopus).
6. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function / Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L.// **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. - 2015. - №64. - P.174-184. (Scopus).
7. Особенности экспрессии молекул-маркеров инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Герцог Г.Е., Попова Н.Н., Салмина А.Б. // **Проблемы эндокринологии**. - 2015. - №4. - С.43-48. (Перечень ВАК РФ).
8. Молекулярные механизмы нейровоспаления и нейрогенеза при болезни Альцгеймера: монография / Комлева Ю.К., Малиновская Н. А., Горина Я. В.,

Лопатина О. Л., Волкова В. В., Пожиленкова Е. А., Жуков Е. Л., Медведева Н. Н., Салмина А. Б. – Изд-во КрасГМУ, Красноярск, 2015. – 165 с. - ISBN 9785942851439.

9. Regenerative potential of the brain: composition and forming of regulatory microenvironment in neurogenic niches / Komleva Yu.K., Kuvacheva N.V., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Teplyashina E.A., Pozhilenkova E.A., Zamay A.S., Morgun A.V., Salmina A.B. // **Human Physiology**. - 2016. - Vol.42, №8. - P.865-873. **(Перечень ВАК РФ)**.

10. Экспериментальные модели болезни Альцгеймера: преимущества и недостатки / Иптышев А.М., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Салмина А.Б. // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2016. - №4. - С.5-21. **(Перечень ВАК РФ)**.

11. Особенности пролиферации и миграции клеток головного мозга при когнитивном тренинге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера / Комлева Ю.К., Горина Я.В., Черных А.И., Лопатина О.Л., Шабалова А.А., Труфанова Л.В., Оловянникова Р.Я., Ендржеевская-Шурыгина В.Ю., Салмина А.Б. // **Бюллетень сибирской медицины**. - 2016. - №6. - С.1-5. **(Перечень ВАК РФ)**.

12. Восьмирукавный радиальный лабиринт как инструмент для оценки пространственного обучения и памяти у мышей / Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Иптышев А.М., Польшников А.М., Салмина А.Б. // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2016. - №5. - С.46-52. **(Перечень ВАК РФ)**.

13. Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Бюллетень сибирской медицины**. - 2017. - №6. - С.1-5. **(Перечень ВАК РФ)**.

14. Экспрессия МАРК и инфламмасом в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии**. - 2017. - Т.11, №4. - С.45-51. **(Перечень ВАК РФ)**.

15. Анализ пространственной памяти у NLRP3-нокаутных животных / Горина Я.В., Иптышев А.М., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2017. - №6. - С.50-56. **(Перечень ВАК РФ)**.

16. Миндалины головного мозга: контроль эмоций и особенности метаболизма глюкозы / Успенская Ю.А., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Оловянникова Р.Я., Ендржеевская-Шурыгина В.Ю., Труфанова Л.В., Салмина А.Б. // **Успехи физиологических наук**. - 2017. - Т.48, №3. - С.45-55. **(Перечень ВАК РФ)**.

17. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Черных А.И., Шабалова А.А., Семенчуков А.А., Оловянникова Р.Я., Салмина А.Б. // **Успехи геронтологии**. - 2017. - №1. - С.49-55. **(Перечень ВАК РФ)**.

18. Сравнение тестов восьмирукавный радиальный лабиринт и водный лабиринт Морриса при оценке пространственной памяти у экспериментальных животных в ходе нейроповеденческого тестирования / Иптышев А.М., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Белова О.А., Салмина А.Б. //

Фундаментальная и клиническая медицина. - 2017. - №2. - С.62-68. **(Перечень ВАК РФ).**

19. Insulin resistance in the development of social and cognitive disorders in Alzheimer disease / Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Chernykh A.I., Salmina A.B. // **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.** - 2017. - №37. - P.198-199. **(Scopus).**

20. Поведенческий фенотипический анализ животных с генетической моделью болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Биомедицина.** - 2017. - №3. - С.47-59. **(Перечень ВАК РФ).**

21. Роль нейровоспаления в реализации когнитивных функций и социального взаимодействия у мышей с возрастзависимой нейродегенерацией / Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** - 2018. - Т.12, №2. - С.27-32. **(Перечень ВАК РФ).**

22. Экспрессия молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** - 2019. - Т.13, №4. - С.1-7. **(Перечень ВАК РФ).**

23. Excitation/inhibition imbalance and impaired neurogenesis in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders / Lopatina O.L., Malinovskaya N.A., Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Shuvaev A.N., Olovyannikova R.Ya., Belozor O.S., Belova O.A., Higashida H.-., Salmina A.B. // **Reviews in the Neurosciences.** - 2019. - Vol.1, №1. - P.1-10. **(Scopus).**

24. Вазкулярный компонент нейровоспаления при экспериментальной болезни Альцгеймера у мышей / Моргун А.В., Осипова Е.Д., Бойцова Е.Б., Лопатина О.Л., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. // **Цитология.** - 2020. - Т.62, №1. - С.16-23. **(Перечень ВАК РФ).**

25. Активность митохондрий в диализате у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера / Горина Я.В., Харитоновна Е.В., Потапенко И.В., Салмина А.Б. // **Журнал эволюционной биохимии и физиологии.** - 2020. - Т.56, №7. - С.567. **(Перечень ВАК РФ).**

26. Абберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Осипова Е.Д., Моргун А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Салмина А.Б. // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2020. - Т.19, №4. - С.46-52. **(Перечень ВАК РФ).**

27. Inflamm-aging and brain insulin resistance: new insights and role of life-style strategies on cognitive and social determinants in aging and neurodegeneration / Komleva Yu.K., Chernykh A.I., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Lokteva I.A., Salmina A.B., Gollasch M. // **Frontiers in Neuroscience.** - 2020. - P.1-10. **(Scopus).**

28. NLRP3 deficiency-induced hippocampal dysfunction and anxiety-like behavior in mice / Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Shuvaev A.N., Chernykh A.I., Potapenko I.V., Salmina A.B. // **Brain Research.** - 2020. - №147220. - P.1-10. **(Scopus).**

29. Expression of NLRP3 inflammasomes in neurogenic niches contributes to the effect of spatial learning in physiological conditions but not in Alzheimer's type neurodegeneration / Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Chernykh A.I., Trufanova L.V., Vais E.F., Haritonova E.V., Zhukov E.L., Vahtina L.Yu., Medvedeva N.N., Salmina A.B. // **Cellular and Molecular Neurobiology**. - 2021. - Vol.41, №1. - P.1-7. (**Scopus**).

30. Optogenetic and chemogenetic modulation of astroglial secretory phenotype / Salmina A.B., Gorina Ya.V., Erofeev A.I., Balaban P.M., Bezprozvanny I.B., Vlasova O.L.// **Reviews in the Neurosciences**. - 2021. - Vol.32, №3. - P.1-10. (**Scopus**).

31. Blood-brain barrier and neurovascular unit in vitro models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration / Salmina A.B., Kharitonova E.V., Gorina Ya.V., Teplyashina E.A., Malinovskaya N.A., Khilazheva E.D., Mosyagina A.I., Morgun A.V., Shuvaev A.N., Salmin V.V., Lopatina O.L., Komleva Yu.K.// **International Journal of Molecular Sciences**. - 2021. - Vol.22, №9. - P.4661-4683. (**Scopus**).

32. Оценка уровня RAGE в клетках гематоэнцефалического барьера при экспериментальной болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Осипова Е.Д., Моргун А.В., Бойцова Е.Б., Лопатина О.Л., Салмина А.Б. // **Цитология**. - 2021. - Т.63, №2. - С.176-183. (**Перечень ВАК РФ**).

33. Особенности экспрессии бета-амилоида в клетках церебрального эндотелия при экспериментальной болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Осипова Е.Д., Моргун А.В., Лопатина О.Л., Харитонов Е.В., Салмина А.Б. // **Молекулярная медицина**. - 2021. - №2. - С.1-6. (**Перечень ВАК РФ**).

34. Особенности экспрессии гена инсулина и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-сигнального пути при болезни Альцгеймера / Горина Я.В., Хилажева Е.Д., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Салмина А.Б. // **Фундаментальная и клиническая медицина**. - 2021. - Т.6, №4. - С.8-21. (**Перечень ВАК РФ**).

35. NLRP3 inflammasome blocking as a potential treatment of central insulin resistance in early-stage Alzheimer / Komleva Yu.K., Potapenko I.V., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Hilazheva E.D., Salmina A.B., Shuvaev A.N. // **International Journal of Molecular Sciences**. - 2021. - Vol.22, №21. - P.1-26. (**Scopus**).

Список сокращений

БА – болезнь Альцгеймера

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

пВПСП – полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы

A β 1-42 – бета-амилоид

Akt – protein kinase B alpha – протеинкиназа B

APP – amyloid precursor protein – белок-предшественник бета-амилоида

CA3 – Cornu Ammonis

ERK1/2 – внеклеточный сигнал-регулируемой киназы 1/2

GFAP – glial fibrillary acidic protein – глиальный фибриллярный кислый белок

GSK-3beta – glycogen synthase kinase 3 – гликогенсинтазы киназы-3-бета

IR – insulin receptor – инсулиновый рецептор

IRAP – insulin regulated aminopeptidase – инсулин-регулируемая аминопептидаза

IRS – insulin receptor substrate – субстрата инсулинового рецептора

MAPK – mitogen-activated protein kinase – митоген-активированная протеинкиназа

PI3K – phosphoinositide-3-kinase – фосфатидилинозитид-3 киназа

PKC – protein kinase C – протеинкиназа C

PSEN – пресенилин

Соискатель:



Горина Я.В.