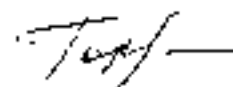


**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи



ГОРИНА

Яна Валерьевна

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

3.3.3 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

д.м.н., профессор

Салмина Алла Борисовна

КРАСНОЯРСК 2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	9
Актуальность темы исследования	9
Цель исследования	17
Задачи исследования	17
Научная новизна	18
Личный вклад соискателя	20
Теоретическая и практическая значимость работы	20
Положения, выносимые на защиту	22
Апробация работы	24
Публикации	25
Структура и объем диссертации	25
Финансовая поддержка работы	25
Благодарности	26
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	27
1.1 Болезнь Альцгеймера и ее характерные особенности	27
1.2 Современные модели болезни Альцгеймера	33
1.3 Особенности развития нейродегенерации у животных с интрагиппокампальным введением бета-амилоида и животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия 5xFAD (Tg6799))	41
1.4 Инсулин и инсулиноподобный фактор роста в головном мозге	46
1.5 Церебральная инсулинорезистентность как патогенетический фактор развития нейродегенеративных заболеваний и метаболических нарушений .	48
1.5.1 Инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера	48
1.5.2 Инсулинорезистентность – связь с сахарным диабетом 2 типа и болезнью Альцгеймера	52
1.6 Роль инсулина в центральной нервной системе	60
1.7 Влияние инсулина на структурно-функциональную целостность ГЭБ в норме и при болезни Альцгеймера	63

1.8 Роль рецептора инсулина в инсулин/ IGF-сигнализации в норме и при болезни Альцгеймера.....	72
1.9 Субстрат рецептора инсулина как важный лиганд в инсулин/ IGF-сигнализации в норме и при болезни Альцгеймера	75
1.10 Инсулин-регулируемый сигнальный путь в головном мозге и его роль в развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа	76
1.10.1 PI3K-Akt-сигнальный путь	78
1.10.2 MAPK-сигнальный путь	80
1.10.3 Инсулин и церебральный метаболизм глюкозы	84
1.11 Значение инсулина в реализации когнитивных функций в норме и при болезни Альцгеймера.....	90
1.12 Молекулы-маркеры и молекулы-мишени церебральной инсулинорезистентности	95
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	102
2.1 Описание животных.....	102
2.2 Дизайн исследования и группы экспериментальных животных	105
2.3 Моделирование нейродегенерации альцгеймеровского типа.....	113
2.4 Нейропсихическое тестирование животных.....	116
2.4.1 Тест «Распознавание нового объекта»	118
2.4.2 Тест «Черно-белая камера»	119
2.4.3 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»	119
2.4.4 Трехкамерный социальный тест.....	120
2.4.5 Тест «Восьмирукавный радиальный лабиринт»	121
2.4.6 Тест «Fear conditioning»	126
2.5 Иммуногистохимическое исследование	129
2.6 Иммуноферментный анализ	131
2.7 Оценка митохондриального трансмембранного потенциала	132
2.8 ПЦР анализ	132
2.9 Электрофизиологическое исследование	133
2.10 Оценка особенностей формирования сосудистой сети (ангиогенеза) ...	135

2.11 Оценка проницаемости ГЭБ <i>in vivo</i>	136
2.12 Моделирование ГЭБ <i>in vitro</i>	136
2.12.1 Получение клеток-компонентов ГЭБ и НВЕ	137
2.12.2 Получение модели ГЭБ и нейроваскулярной единицы <i>in vitro</i>	139
2.12.3 Разработка статической и динамической модели ГЭБ <i>in vitro</i>	139
2.12.4 Иммуногистохимическое исследование	142
2.13 Регистрация трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС)	143
2.14 Модуляция экспрессии RAGE и регистрация ТЭС.....	144
2.15 Оценка проницаемости ГЭБ <i>in vitro</i>	145
2.16 Оценка особенностей ангиогенеза и иммуногистохимическая регистрация целевых молекул.....	145
2.17 Статистический анализ	146
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	148
3.1 Особенности реализации эмоций и когнитивных функций у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера	148
3.1.1 Результаты нейроповеденческого тестирования «Fear conditioning»	149
3.1.2 Результаты нейроповеденческого тестирования «Распознавание нового объекта».....	151
3.1.3 Результаты нейроповеденческого тестирования «Черно-белая камера».....	154
3.1.4 Результаты нейроповеденческого тестирования «Приподнятый крестообразный лабиринт»	157
3.1.5 Результаты нейроповеденческого тестирования «Трехкамерный социальный тест»	161
3.1.6 Результаты нейроповеденческого тестирования «Восьмирукавный радиальный лабиринт»	165
3.2 Особенности экспрессии и функциональной активности молекул- компонентов инсулин-опосредованных сигнальных путей и	

инсулинорезистентности в норме и при экспериментальной	болезни
Альцгеймера	169
3.2.1 Экспрессия мРНК инсулина в норме и при экспериментальной болезни	
Альцгеймера	170
3.2.2 Уровень лактата и инсулина в различных регионах головного мозга в	
норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера	172
3.2.3 Экспрессия IR и IRS1 в нейронах гиппокампа головного мозга при	
экспериментальной болезни Альцгеймера	175
3.2.4 Экспрессия маркера инсулинорезистентности – инсулинрегулируемой	
аминопептидазы (IRAP) на клетках нейрональной и глиальной природы, и	
совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером (GLUT4)....	177
3.2.5 Оценка трансмембранного потенциала митохондрий головного мозга	
животных в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера	186
3.2.6 Экспрессия молекул - компонентов инсулин-опосредованной	
сигнальной трансдукции в клетках головного мозга при экспериментальной	
болезни Альцгеймера.....	189
3.3 Оценка изменения проницаемости ГЭБ, церебрального ангиогенеза и	
микроциркуляции при экспериментальной болезни Альцгеймера,	
ассоциированной с развитием локальной инсулинорезистентности	197
3.3.1 Экспрессия CD31 в субрегионах гиппокампа у животных с	
генетической моделью болезни Альцгеймера.....	198
3.3.2 Особенности формирования сосудистой сети в гиппокампе	
(ангиогенез и ремоделирование сосудистой сети) у животных с	
генетической моделью болезни Альцгеймера.....	200
3.3.3 Экспрессия бета-амилоида (A β) и Fe65 в клетках эндотелия	
гиппокампа у животных с экспериментальной моделью болезни	
Альцгеймера.....	203
3.3.4 Проницаемость ГЭБ <i>in vivo</i> у животных с генетической моделью	
болезни Альцгеймера.....	209

3.3.5 Экспрессия RAGE-белков на клетках эндотелия у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера.....	211
3.4 Оценка роли RAGE-опосредованных механизмов в регуляции проницаемости ГЭБ и ангиогенеза в норме и при моделировании болезни Альцгеймера <i>in vitro</i>	214
3.4.1 Оценка экспрессии RAGE в клетках эндотелия церебральных микрососудов, маркера ангиогенеза (VEGFR2), белков плотных и адгезивных контактов церебрального эндотелия (JAM1 и ZO1)	215
3.4.2 Изменение ТЭС при модуляции RAGE в клетках эндотелия церебральных сосудов в составе динамической модели ГЭБ <i>in vitro</i>	220
3.4.3 Особенности проницаемости эндотелиальных клеток ГЭБ для высокомолекулярных соединений <i>in vitro</i> при модуляции RAGE.....	222
3.4.4 Особенности ангиогенеза при RAGE-модуляции в эндотелиальных клетках церебральных сосудов в составе модели ГЭБ <i>in vitro</i>	224
3.5 Особенности нейропластичности и синаптической передачи в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера	230
3.5.1 Экспрессия γ H2AX в нейронах гиппокампа у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера	231
3.5.2 Синаптическая передача в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера	234
3.5.2.1 Влияние бета-амилоида на синаптическую передачу в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера	236
3.5.2.2 Влияние инсулина на синаптическую передачу в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера	239
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	247

4.1 Особенности экспрессии и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-опосредованных сигнальных путей и инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера	248
4.1.1 Оценка мРНК инсулина, уровня инсулина и лактата в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера.....	248
4.1.2 Аберрантная экспрессия молекул-компонентов инсулин-сигнального пути при экспериментальной болезни Альцгеймера	254
4.1.3 Оценка мембранного потенциала митохондрий головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера	261
4.1.4 Влияние резистентности головного мозга к инсулину на нарушение метаболизма глюкозы при экспериментальной болезни Альцгеймера	265
4.2 Особенности изменения проницаемости ГЭБ, церебрального ангиогенеза и микроциркуляции при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью.....	271
4.2.1 Нарушение экспрессии CD31 в церебральных микрососудах при экспериментальной болезни Альцгеймера	273
4.2.2 Аберрантный ангиогенез и проницаемость ГЭБ при экспериментальной болезни Альцгеймера	275
4.2.3 Нарушение экспрессии Fe65, Abeta и RAGE в клетках церебрального эндотелия при экспериментальной болезни Альцгеймера	278
4.2.4 Роль RAGE-опосредованных механизмов в регуляции проницаемости ГЭБ и ангиогенеза при экспериментальной болезни Альцгеймера <i>in vitro</i>	283
4.3. Нарушение нейропластичности и синаптической передачи в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера	289
4.3.1 Нейрональная экспрессия γ H2AX - маркера окислительного повреждения ДНК при развитии болезни Альцгеймера	289
4.3.2 Влияние бета-амилоида на синаптическую передачу в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера	291

4.3.3 Влияние инсулина на синаптическую передачу в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера.....	295
4.4 Особенности развития поведенческих и когнитивных нарушений у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью.....	300
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	316
ВЫВОДЫ	324
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	327
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	329

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Болезнь Альцгеймера является одной из ведущих неврологических заболеваний, диагностируемой у пожилых людей и являющейся наиболее частой формой деменции [47]. По прогнозам ученых распространенность болезни Альцгеймера во всем мире составит от 84 миллионов к 2040 году до более 100 миллионов к 2050 году [111, 622]. В этом контексте, деменция имеет серьезные социальные и экономические последствия с точки зрения прямых затрат на медицинское и социальное обслуживание. Так, в 2015 г общие глобальные социальные издержки на деменцию оценивались в 818 миллиардов долларов США, что эквивалентно 1,1% мирового валового внутреннего продукта – ошеломляющие расходы, которые выросли на 35% с 2010 года [158, 577]. По предварительным оценкам, к 2030 г глобальные затраты на деменцию могут вырасти до 2 триллионов долларов США, что существенно может перегрузить системы здравоохранения и социальной помощи [221, 819].

В связи с этим болезнь Альцгеймера признана Всемирной организацией здравоохранения в качестве глобального приоритета в области общественного здравоохранения. Несмотря на значительный прогресс в понимании патогенеза и концептуального представления о болезни Альцгеймера с тех пор, как Алоис Альцгеймер в 1907 г сообщил о первом случае заболевания [213], до сих пор не существует как эффективных методов профилактики, предотвращающих возникновение заболевания, так и простых, безопасных, специфичных и действенных способов лечения, способных остановить ее прогрессирование.

Важно отметить, что распространенность болезни Альцгеймера увеличивается по мере старения, а именно, у 3% людей наблюдается в возрасте 65–75 лет, у 17% людей в возрасте 75–84 лет и у 32% людей старше 84 лет [48].

Вместе с тем, недавние исследования убедительно показывают, что в ближайшие годы наибольший рост распространенности деменции ожидается в странах с низким и средним уровнем доходов, в которых наблюдается выраженная тенденция роста сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонии и сахарного диабета [159, 733, 823].

Болезнь Альцгеймера 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 болезни Альцгеймера является спорадическая, в которой главными факторами риска выступают возраст и наличие в семейном анамнезе деменции, поскольку более одной трети пациентов с болезнью Альцгеймера имеют одного или нескольких родственников первой степени родства [209, 400].

Согласно многочисленным исследованиям [93, 554, 631] болезнь Альцгеймера имеет несколько общих молекулярных и клеточных особенностей с сахарным диабетом 1-го, 2-го типа и инсулинорезистентностью, связанных с нарушением памяти и когнитивных функций, что дает основание называть болезнь Альцгеймера специфической для головного мозга формой «диабета 3-го типа».

Известно, что молекулы, способные регулировать метаболизм глюкозы, такие как инсулин, инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) и глюкагоноподобный пептид-1 не только модулируют различные функции коры и гиппокампа – двух ключевых областей мозга, отвечающих за обучение и память, но и играют значимую роль в процессах развития и старения [59, 94].

При этом необходимо отметить, что синтез инсулина *de novo* в головном мозге был предложен в качестве альтернативного источника инсулина в ЦНС. Эта гипотеза была подтверждена обнаружением мРНК препроинсулина I и II в мозге плода крысы и культивируемых нейронах, а также иммунореактивностью

инсулина в эндоплазматическом ретикулуме нейронов, аппарате Гольджи, цитоплазме, аксоне, дендритах и синапсах [217]. Кроме того, присутствие инсулина в незрелых нервных клетках [679], быстрый транспорт периферически введенного инсулина в спинномозговую жидкость [260] и тот факт, что лишь менее 1% гормона проникает через ГЭБ у собак и грызунов [79] еще раз подтверждают идею о том, что инсулин может быть синтезирован в головном мозге. Может ли инсулин синтезироваться нервными клетками и если да, то как уровень мРНК инсулина меняется в условиях отсого токсического действия бета-амилоида?

Убедительные результаты многочисленных исследований по обнаружению инсулина в мозге дают веское основание считать головной мозг ключевым органом-мишенью для инсулина [16, 287, 446, 569]. Действительно, инсулин выполняет несколько функций в ЦНС, начиная от регуляции синтеза белка и экспрессии белков цитоскелета до разрастания, миграции и дифференцировки нейритов, а также образования синапсов [98]. Данные функции инсулина напрямую связаны с когнитивными процессами, включая внимание, исполнительные функции, обучение и память [614]. Важно и то, что инсулин обладает нейропротективной активностью, ингибируя апоптоз, окислительный стресс, ишемию и нейротоксическое действие бета-амилоида [851].

В настоящее время общепризнано, что патологическое изменение уровня инсулина / передачи 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 могут увеличивать риск развития деменции [52, 498, 575].

Исследование головного мозга пациентов с легкими когнитивными нарушениями, а также пациентов с болезнью Альцгеймера выявило ключевые признаки церебральной инсулинорезистентности, в частности, снижение уровня инсулинового рецептора (IR) и повышение фосфорилирования

субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1) по остатку серина, особенно в гиппокампе, коре и гипоталамусе [257, 409, 551]. Так, накопление олигомеров бета-амилоида, ингибируя фосфорилирование IR, вызывает снижение экспрессии IR и IRS1 в нейронах гиппокампа [480, 864]. Указанные патологические изменения приводят к aberrантной передаче сигналов по 2 основным путям – MAPK и PI3K-Akt. Это провоцирует снижение поглощения глюкозы, апоптоз и активацию гиперфосфорилирования тау-белка [417]. Более того, действие сублетальной концентрации бета-амилоида *in vitro* вызывает ингибирование как MAPK / ERK, так и PI3K / Akt- пути в нейрональных клетках, тем самым способствуя увеличению уровня провоспалительных цитокинов, развитию митохондриальных нарушений и гибели нейронов [773].

Существуют весьма противоречивые литературные данные, касающиеся изменения уровня экспрессии GSK3-beta в головном мозге при развитии хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа. Так установлено, что бета-амилоид подавляет передачу сигналов инсулина по PI3K-пути, способствует снижению Akt, что приводит к патологическим изменениям в регуляции активности GSK3-beta – фермента, участвующего в фосфорилировании тау-белка. Это провоцирует гиперфосфорилирование тау-белка [454], развитие синатической дисфункции, апоптоз и, в конечном итоге, прогрессирование заболевания [331].

В то же время результаты другого исследования демонстрируют тот факт, что олигомеры бета-амилоида действуют как активаторы передачи сигналов по пути PI3K–Akt– mTOR в ткани нижней теменной доли головного мозга как на стадии умеренных когнитивных нарушений, так и при прогрессировании болезни Альцгеймера [779].

Ряд исследований показали, что активация PKC оказывает позитивное влияние на продукцию нейропротективного растворимого белка-предшественника бета-амилоида sAPP α , увеличивая его уровень, и напротив, снижает концентрацию нейротоксичных форм бета-амилоида *in vitro* и *in vivo* [43]. Показано, что у пациентов с болезнью Альцгеймера бриостатин –

активатор PKC – увеличивал секрецию фибробластами α -секретазы, которая участвует в образовании sAPP α , а у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера снижал уровень олигомеров бета-амилоида, а также оказывал положительное влияние на когнитивные функции [39].

Однако какие патологические события, связанные с экспрессией молекул-компонентов (PKC, GSK-3 β , MAPK) 2 основных инсулин-сигнальных путей – MAPK и PI3K-Akt, происходят в нейронах миндалевидного тела (структуре головного мозга, находящейся в тесной взаимосвязи с гиппокампом, и отвечающей за реализацию ассоциативного обучения и эмоциональной памяти) под влиянием острого токсического действия бета-амилоида и его хронической аккумуляции?

Важно подчеркнуть и тот установленный факт, что церебральная инсулинорезистентность и нарушение метаболизма глюкозы в головном мозге являются патофизиологическими особенностями, которые могут даже предшествовать другим нейропатологическим изменениям на несколько десятилетий до развития болезни Альцгеймера [211, 595, 818].

Как известно, снижение экспрессии транспортера глюкозы GLUT4, вызванное нарушением передачи сигналов инсулина, взаимосвязано с уменьшением поглощения глюкозы нервными клетками [756]. Также необходимо принять во внимание тот факт, что активность GLUT4 в нейронах находится под контролем IRAP. Согласно результатам исследования у мышей, нокаутных по IRAP, установлено заметное уменьшение стимулированного инсулином захвата глюкозы мышечной и жировой тканью [410]. При этом остается открытым вопрос – какое влияние оказывает токсическое действие бета-амилоида и его хроническая аккумуляция на уровень IRAP и IRAP/GLUT4 в нейронах миндалевидного тела?

Установлено, что высокие уровни маркеров инсулинорезистентности связаны с низкими показателями в когнитивных тестах по оценке эпизодической и рабочей памяти, причем в независимости от наличия сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков, что дает возможность

предполагать о важной роли передачи сигналов инсулина в функционировании нейронов [3, 94].

Действительно, гиппокамп и базолатеральные ядра миндалевидного тела содержат большое количество глутаматергических нейронов [232], на которые инсулин оказывает непосредственное влияние [513]. Доказано, что эффекты инсулина на головной мозг реализуются через инсулиновые рецепторы, которые представлены в различных отделах головного мозга, и в частности, в гиппокампе и миндалевидном теле [573]. Так, заметное подавление глутаматергической нейротрансмиссии в CA1 области гиппокампа наблюдалось у мышей, нокаутных по IRS [523]. В дополнение к этому у крыс с гиппокампальной инсулинорезистентностью выявлено нарушение долговременной потенциации, обусловленное снижением экспрессии и фосфорилирования субъединиц рецептора глутамата, опосредованное инсулином [294]. Однако нерешенным остается вопрос, касающийся эффектов инсулина на нейроны миндалевидного тела в условиях острого токсического действия бета-амилоида.

Показано, что эндотелий церебральных сосудов экспрессирует IR. При этом инсулин, связываясь с рецептором, оказывает воздействие на церебральные микрососуды, регулируя их функцию за счет чередования вазодилатации и вазоконстрикции [562].

В ходе исследования пациентов с инсулинорезистентностью выявлено выраженное снижение церебрального кровотока в коре и цереброваскулярной реактивности, что предполагает существование инсулиноопосредованного поддержания функций эндотелия [661].

Известно, что накопление бета-амилоида встречается как в паренхиме головного мозга, так и в стенках церебральных кровеносных сосудов, что может спровоцировать развитие эндотелиальной дисфункции, и, как следствие, нарушение целостности ГЭБ [789]. Ряд исследований демонстрируют, что нарушение структурно-функциональной целостности нейроваскулярной единицы вносит вклад в возникновение и прогрессирование болезни

Альцгеймера, тем самым предполагая наличие тесной связи между церебральными нарушениями микроциркуляции и нейродегенерацией [665]. Так, в ходе исследования пациентов с болезнью Альцгеймера установлено уменьшение экспрессии CD31 [507], тогда как у пациентов с синдромом Дауна и сочетанным развитием болезни Альцгеймера наблюдалось значительное снижение числа микрососудов и целостности эндотелия [212]. Тем не менее не до конца ясными являются механизмы, лежащие в основе нарушения целостности ГЭБ при токсическом действии бета-амилоида?

Согласно экспериментальным данным *in vitro*, бета-амилоид, связываясь с RAGE, активирует генерацию активных форм кислорода (АФК), что приводит к эндотелиальной дисфункции и нарушению целостности ГЭБ [127]. Кроме того, в исследованиях *in vivo* с использованием мышиной модели болезни Альцгеймера установлено нарушение целостности церебральных капилляров в области отложения амилоидных бляшек, что ассоциировано с повышением уровня RAGE [437].

При этом важным моментом является изучение возможности модуляции активности RAGE с целью предотвращения прогрессирования патологических изменений в структуре ГЭБ и его функций.

Все вышесказанное указывает на существование тесной и сложной связи между гиперинсулинемией / инсулинорезистентностью, сахарным диабетом 2 типа и болезнью Альцгеймера. Эта взаимосвязь обусловлена развитием общих патологических событий, а именно, нарушением церебральной инсулин-сигнальной трансдукции, активацией воспалительных реакций, окислительным стрессом, aberrantным механизмом передачи сигналов гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3beta), активным образованием бета-амилоида из APP, формированием нейрофибрилярного клубка, нарушением регуляции активности ацетилхолинэстеразы, что в совокупности находит свое отражение в развитии когнитивной дисфункции [118, 814].

Несмотря на то, что до настоящего времени было проведено значительное количество исследований по изучению клеточного и молекулярного

механизмов развития болезни Альцгеймера, однако до сих пор остается еще несколько вопросов, касающихся участия компонентов инсулин-сигнального пути в патогенезе заболевания:

1. Что может обуславливать нарушение передачи сигналов инсулина в головном мозге при развитии болезни Альцгеймера?

2. Может ли инсулин синтезироваться нервными клетками или в качестве основного источника церебрального инсулина выступает периферический инсулин?

3. Какие молекулярные механизмы являются основополагающими в нарушении нейрональной передачи сигналов инсулина в головном мозге при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа?

4. Что лежит в основе нарушения структурно-функциональной целостности ГЭБ в результате токсического действия бета-амилоида при развитии болезни Альцгеймера? Возможно ли нивелировать негативные эффекты бета-амилоида, модулируя проницаемость ГЭБ?

5. Является ли повышенная проницаемость церебральных микрососудов и нарушение процесса неоангиогенеза одним из ключевых факторов, способствующих развитию церебральной амилоидной ангиопатии при болезни Альцгеймера?

6. Какое действие оказывает бета-амилоид на синаптическую пластичность в гиппокампе и миндалевидном теле – областях головного мозга, ответственных за реализацию когнитивных функций и запоминания, сопряженных с эмоциональной окраской событий?

7. Оказывает ли влияние инсулин на синаптическую передачу в миндалевидном теле – области головного мозга, имеющей непосредственное отношение к формированию эмоциональной памяти при развитии болезни Альцгеймера?

Поэтому понимание каскада патологических изменений, который в конечном итоге предшествует агрегации бета-амилоида и гиперфосфорилированию тау-белка, является центральным для оценки

«фактора риска» и определения новых терапевтических целей, которые можно использовать для профилактических вмешательств.

Цель исследования

Изучить клеточно-молекулярные механизмы формирования локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга и ее последствий для клеток нейрональной и эндотелиальной природы 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 церебральном эндотелии при экспериментальной болезни Альцгеймера.

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

3. Исследовать патогенетические механизмы повреждения ГЭБ и особенности церебрального ангиогенеза при нейродегенерации альцгеймеровского типа при формировании локальной инсулинорезистентности

4. Оценить вклад RAGE в развитие нарушений церебрального ангиогенеза и проницаемости ГЭБ при экспериментальной болезни Альцгеймера при формировании локальной инсулинорезистентности.

5. Разработать современную 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.

Настоящее исследование впервые продемонстрировало, что в нейронах миндалевидного тела головного мозга хроническая аккумуляция бета-амилоида (мышь линии 5xFAD) 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 дает возможность предположить новую 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. Впервые обнаружено, что в нейронах миндалевидного тела в условиях острого токсического действия бета-амилоида 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. Это показывает, что инсулин-регулируемая синаптическая пластичность модулируется бета-амилоидом, что негативно отражается на процессах обучения и памяти.

Получены новые данные о механизмах развития церебральной амилоидной ангиопатии в результате хронической аккумуляции бета-амилоида. Впервые у мышей линии 5xFAD зарегистрировано 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 бета-амилоида 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 бета-амилоида *in vitro* впервые показано, что в церебральном эндотелии подавление экспрессии RAGE (с применением siRNA RAGE) улучшает параметры целостности гемато-энцефалического барьера, что может быть использовано для управления патологической проницаемостью 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 β 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-3beta, MAPK, IRAP, PKC); молекул, участвующих в реализации биологических

эффектов $A\beta$ 1-42 (Fe65, RAGE), а также молекул-регуляторов проницаемости гематоэнцефалического барьера или неангиогенеза (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.

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, выполняла нейроповеденческое тестирование животных, проводила забор необходимого биологического материала с последующим анализом биологических образцов и интерпретацией полученных экспериментальных данных.

Участие соискателя в научной работе представлено в опубликованных трудах. Личный вклад соискателя при осуществлении комплексных экспериментальных исследований составил от 55 до 95%, в подготовку тезисов докладов и статей в соавторстве – от 50 до 85%.

Индекс Хирша автора диссертации по результатам 2021 года - 6 (по базе данных Web of Science), 7 (по базе данных Scopus), 7 (по базе данных РИНЦ).

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 (учебное пособие для аспирантов), 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^SwF^Lon,PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799Vas. 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. Также в ходе проведения исследований были использованы такие методы как, иммуноферментный анализ, электрофизиологическое исследование, ПЦР, моделирование ГЭБ *in vitro*. Была проведена статистическая обработка полученных результатов.

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 бета-амилоида 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 бета-амилоида 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 бета-амилоида 1-42 и при хронической его аккумуляции регистрируется накопление γ H2AX, что свидетельствует о генотоксическом эффекте бета-амилоида 1-42. Бета-амилоид 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 бета-амилоида 1-42 приводит к нарушению структурной целостности гемато-энцефалического барьера за счет увеличения в эндотелии гиппокампа экспрессии A β , а также молекул, участвующих в реализации биологических эффектов бета-амилоида 1-42 (Fe65, RAGE), нарушения церебрального ангиогенеза и ремоделирования сосудистой сети, повышения проницаемости ГЭБ.

4. Моделирование болезни Альцгеймера *in vitro* сопровождается повышением проницаемости ГЭБ, что сопряжено с нарушением церебрального ангиогенеза, увеличением экспрессии в эндотелии рецепторов конечных продуктов гликирования белков RAGE. Подавление экспрессии 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 результатов

Экспериментальные данные получены с использованием современных методических подходов, современных валидированных моделей болезни Альцгеймера на экспериментальных животных, с применением 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.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы были 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).

Публикации

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

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа оформлена в соответствии 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 источника (24 отечественных и 854 иностранных). Диссертация иллюстрирована 5 таблицами, 69 рисунками.

Ссылки и список литературы оформлены при использовании программы работы с библиографией «Zotero» и автоматическим подключением ГОСТ 7.0.5.-2008 (numeric, sorted alphabetically, Russian; <https://www.zotero.org/>).

Финансовая поддержка работы

Эксперименты в рамках диссертационной работы проведены при поддержке гранта 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.).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность:

- д.б.н., доценту Юлии Константиновне Комлевой и д.б.н., PhD, доценту Ольге Леонидовне Лопатиной за совместную научную работу в области нейрохимии и нейробиологии, за активное участие в организации и осуществлении экспериментальной деятельности, анализе полученных результатов, а также подготовки рукописей к публикации в реферируемых научных журналах;

- к.м.н., PhD Антону Николаевичу Шуваеву и аспиранту Илье Викторовичу Потапенко за активное участие в организации и осуществлении электрофизиологических исследований, а также анализе полученных результатов;

- д.м.н. Моргуну Андрею Васильевичу и научному сотруднику Хилажевой Елене Дмитриевне за активное участие в организации и проведении исследований *in vitro*, обработке и анализе полученных экспериментальных данных;

- коллективу НИИ молекулярной медицины и патобиохимии (ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, руководитель – к.м.н., PhD, А.Н. Шуваев) за содействие в подготовке, представлении, публичной защите и обсуждении диссертации.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

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 [21, 555].

Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании этиологии и патогенеза болезни Альцгеймера, а также в разработке потенциальных методов лечения, в настоящее время еще остается открытым вопрос ранней диагностики и эффективной терапии с учетом сопутствующих патогенетических факторов, в частности, инсулинорезистентности [58, 208, 339].

В этом литературном обзоре рассмотрены характерные особенности болезни Альцгеймера, инсулинорезистентность как ключевой фактор индукции нейродегенерации альцгеймеровского типа, и ее взаимосвязь с метаболическими нарушениями (сахарным диабетом 2 типа), роль инсулина в ЦНС, церебральная инсулин-сигнальная трансдукция в норме и при болезни Альцгеймера, а также значимые молекулы в инсулин-сигнальном пути как перспективные мишени для фармакологической коррекции нейродегенерации, ассоциированной с развитием церебральной инсулинорезистентности.

1.1 Болезнь Альцгеймера и ее характерные особенности

Болезнь Альцгеймера представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, в основном характеризующееся нарушением памяти и когнитивных функций, что приводит к значительному ухудшению качества жизни. В настоящее время у 45 миллионов человек во всем мире выявлена болезнь Альцгеймера, при этом неправильное лечение

увеличит данный показатель к 2050 до 131 миллиона [623]. На макроскопическом уровне наблюдается атрофия головного мозга, что является ключевым невропатологическим признаком заболевания, тогда как на микроскопическом уровне – отложение амилоидных бляшек, формирование нейрофибриллярных клубков, а также значительная гибель нейронов [364, 524], синаптическая дисфункция и функциональные нарушения митохондриальных структур [453].

Болезнь Альцгеймера является многофакторным и сложным заболеванием и основной причиной деменции среди пожилых людей. Хотя пожилой возраст является наиболее известным фактором риска развития заболевания, у некоторых людей он может развиваться в более молодом возрасте. Исходя из этого, болезнь Альцгеймера классифицируется на два типа [100]: 1) семейная форма, которая обычно развивается до 65 лет, и вызывается редкими и доминантно наследуемыми мутациями в генах APP [279], пресенилина 1 и пресенилина 2 (PSEN1 и PSEN2) [39]; 2) спорадическая форма проявляется уже после 65 лет и связана с мутацией гена аполипопротеина E (APOE) [49].

Важно отметить, что как генетические факторы, так и различные факторы окружающей среды, включая воздействие металлов, таких как ртуть, алюминий, цинк, медь и свинец [117, 660] играют ключевую роль в возникновении, прогрессировании и тяжести заболевания [17, 273]. При этом метаболизм различных металлов тесно связан с дисфункцией митохондрий, продуцированием активных форм кислорода и инициированием апоптоза [117, 660].

Патофизиология семейной и спорадической форм болезни Альцгеймера имеет много общего, а именно: внутриклеточная продукция и накопление токсического бета-амилоида ($A\beta$) в результате расщепления APP β - и γ -секретазой, фосфорилирование и агрегация тау-белка, а также нарушение внутриклеточного транспорта. Вместе, эти события вызывают токсическое повреждение органелл, что приводит к увеличению продукции активных форм кислорода, которая замыкает порочный круг за счет дополнительного

фосфорилирования тау-белка и окислительного повреждения органелл [209]
(рисунок 1).

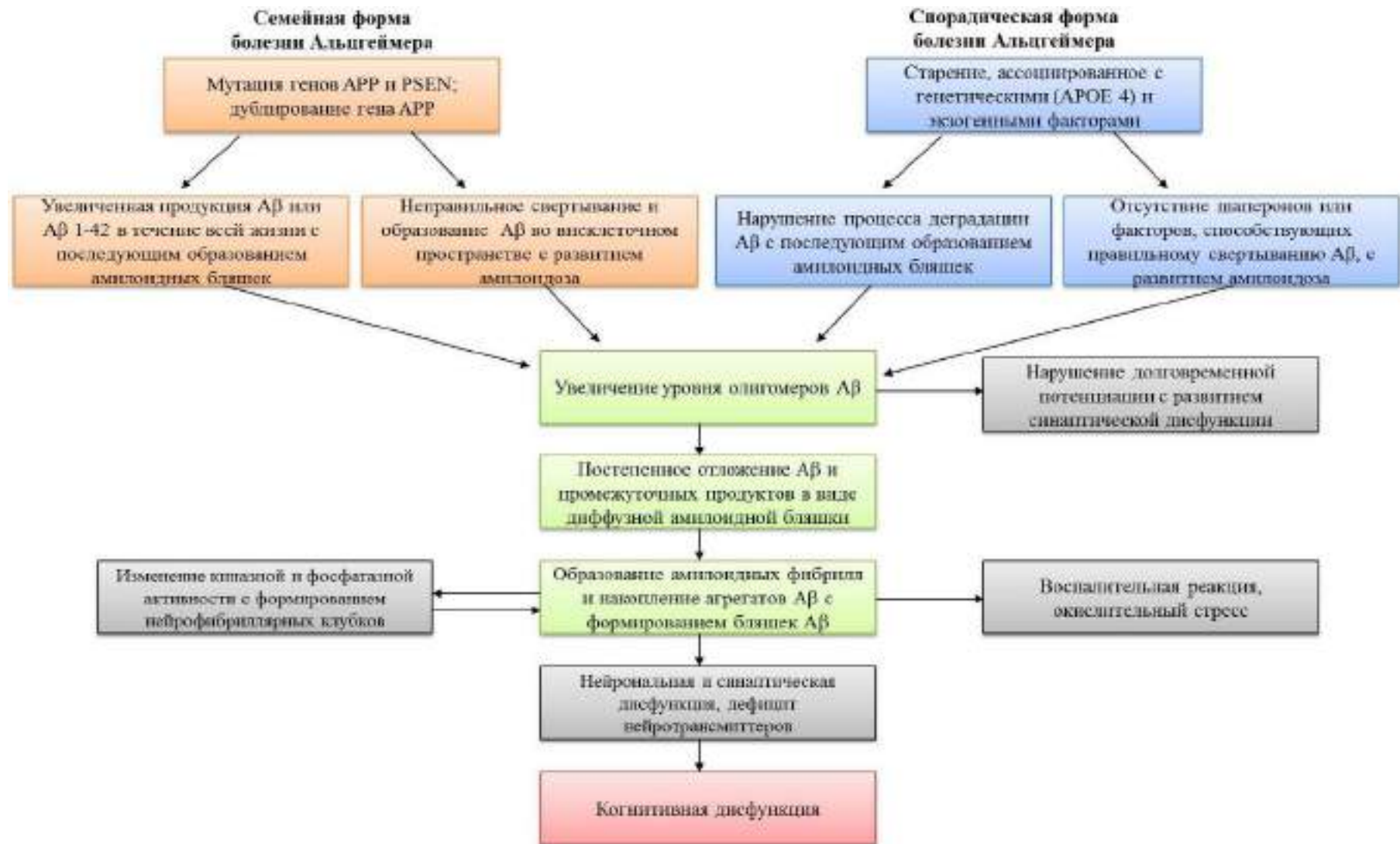


Рисунок 1 – Гипотеза амилоидного каскада как основная гипотеза патогенеза болезни Альцгеймера (на основании литературных данных)

Основным белковым компонентом амилоидных бляшек является бета-амилоид, состоящий из 38-43 аминокислотных остатков, полученный путем расщепления трансмембранного APP двумя ферментами – β -секретазой и γ -секретазой [314]. Активный ферментативный компонент комплекса γ -секретазы пресенилин расщепляет APP на нескольких участках, что приводит к образованию пептидов бета-амилоида различной длины, таких как A β 1-38, A β 1-40 и A β 1-42. На агрегацию бета-амилоида влияет его взаимодействие с бета-амилоид-связывающими молекулами, в частности, с APOE во внеклеточном пространстве [850]. APOE человека имеет три общих аллеля (+2, +3 и +4), при этом аллель +4 является генетическим фактором риска развития болезни Альцгеймера, тогда как аллель +2 выполняет защитную функцию [164, 390].

Другим отличительным признаком болезни Альцгеймера являются нейрофибриллярные клубки – внутриклеточные структуры, состоящие преимущественно из гиперфосфорилированного тау-белка, который синтезируется во всех нейронах, а также присутствует в глиальных клетках. Тау-белок, связываясь с тубулином, стабилизирует микротрубочки. В физиологических условиях фосфорилирование / дефосфорилирование тау-белка является динамическим процессом, необходимым для нормального функционирования тау-белка [386].

Гиперфосфорилирование тау-белка может быть следствием дисбаланса таукиназы и фосфатазы, приводя к дестабилизации микротрубочек и образованию нейрофибриллярных клубков, что способствует нейронной дисфункции и коррелирует с клиническим прогрессированием болезни Альцгеймера [717]. Однако бета-амилоид является не единственным фактором, который стимулирует агрегацию тау-белка, а именно, уровень тау, его последовательность и степень фосфорилирования, тем самым указывая, что повреждение головного мозга в результате отложения нейрофибриллярных клубков может прогрессировать независимо от бета-амилоида [713].

Стоит отметить, что наличие бета-амилоидных бляшек в головном мозге является первым детектируемым биомаркером, затем выявляют гиперфосфорилированный тау-белок в спино-мозговой жидкости, тогда как когнитивная дисфункция, как главный симптом прогрессирующего заболевания, проявляется на поздних этапах, а именно, через 10-15 лет после отложения бета-амилоида и нейрофибриллярных клубков [12, 849]. Примечательно, что столь постепенное развитие нейродегенерации предоставляет возможность для раннего вмешательства.

С момента открытия болезни Альцгеймера было выполнено значительное количество исследований как этиологии, так и патогенеза данного заболевания, что послужило основанием для выдвижения «амилоидной гипотезы» [565] и тау-гипотезы [101].

Однако по результатам исследований, проведенных за последнее десятилетие, было сформулировано предположение, согласно которого высокая продукция и интенсивное отложение бета-амилоида не является магистральным событием, запускающим каскад патологических реакций, приводящих к развитию болезни Альцгеймера, тогда как на первый план выходят нарушение синаптической пластичности и структурно-функциональной целостности митохондрий, гибель нейронов и гиперфосфорилирование тау-белка [23, 729, 731, 788].

Таким образом, этиология и патогенез нейродегенерации альцгеймеровского типа остается до конца невыясненным, в частности, молекулярные механизмы, лежащие в основе различных патологических изменений, которые приводят к нарушению когнитивных функций, связанных с обучением и памятью.

1.2 Современные модели болезни Альцгеймера

Важным моментом, связанным со значительным ростом распространенности болезни Альцгеймера и деструктивным характером ее симптоматики, также является необходимость более подробного и глубокого исследования ключевых механизмов, которые лежат в основе как психических, так и когнитивных нарушений, с применением современных генетических моделей болезни Альцгеймера, которые позволяют более четко отразить патогенез заболевания, а также изучить влияние наследственных факторов.

Для исследования патогенеза нейродегенерации альцгеймеровского типа и ее взаимосвязи с выраженным проявлением когнитивной дисфункции и психических нарушений, был разработан ряд моделей на животных (в частности, грызунах).

Так, открытие мутаций гена APP, PSEN1 и PSEN2, обуславливающих развитие семейной формы болезни Альцгеймера [175, 275], дало уникальную возможность для создания большого количества моделей с бета-амилоидной патологией на трансгенных мышах, тем самым делая их ценным инструментом не только для изучения патогенеза заболевания, но и поиска специфических молекул-маркеров для диагностики уже на ранней стадии развития заболевания [598, 856]. Примечательно, что мутации тау-белка, являющиеся ключевым фактором развития лобно-височной долевой дегенерации, были применены в качестве триггера для развития таупатии у грызунов [253]. Несмотря на полученные Adams S.J. и соавторами доказательства того, что повышенная экспрессия мышинового тау-белка способствует возраст-ассоциированной активации гиперфосфорилирования тау-белка [31], при создании генетических моделей предпочтительно использование человеческих генетических конструкций, позволяющих проявлять непредвиденные эффекты по сравнению с мышинными эндогенными гомологами. При этом сочетание мутаций

нескольких генов при разработке трансгенной модели дает возможность создания модели с ускоренным развитием болезни Альцгеймера [385].

В наибольшей степени используемый способ создания генетических моделей мышей с болезнью Альцгеймера основан на гиперэкспрессии человеческого APP, тем самым воспроизводя развитие семейной формы болезни (**таблица 1**).

Таблица 1 – Трансгенные мышинные модели амилоидной патологии при болезни Альцгеймера

Модель животных	Трансген	Амилоидоз	Другие патологические характеристики	Нарушение поведения в поведенческих тестах
Tg2576	Человеческий APP695 (шведский)	Бляшки A β в возрасте 10-12 месяцев, образование олигомеров A β	Синаптическая дисфункция в возрасте 15-18 месяцев	Нарушение поведения в тестах «Распознавание новых объектов» в возрасте 12-15 месяцев, «Водном лабиринте Морриса» в возрасте 6 месяцев и «Y-лабиринте» в возрасте 10 месяцев [354, 591, 816].
TgAPP23	Человеческий APP751 (шведский)	Бляшки A β в возрасте 6 месяцев	Повышенный уровень гиперфосфорилированного тау-белка в возрасте 6 месяцев, отложение нейрофибриллярных клубков вокруг бляшек A β в возрасте 12 месяцев, потеря нейронов в CA1 области гиппокампа в возрасте 14-18 месяцев.	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 3-4 месяцев, в тесте «Водный лабиринт Морриса» в возрасте 3 месяцев [362, 743, 795].
PDAPP	Человеческий APP (Индиана)	Бляшки A β в возрасте 6-9 месяцев	Синаптическая дисфункция.	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 6 месяцев, в тесте «Водный лабиринт Морриса» в возрасте 3 месяцев [138, 267].

J20	Человеческий APP (шведский и штат Индиана)	Диффузные отложения A β в возрасте 5-6 месяцев и более крупные нейритные бляшки A β в возрасте 9 месяцев	Фосфонеурофиламенты.	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 4 месяцев, в тесте «Водный лабиринт Морриса» в возрасте 6-9 месяцев [51, 228, 557, 593].
TgCRND 8	Человеческий APP695 (Шведский и Индиана)	Бляшки A β в возрасте 3 месяцев, плотные ядра бляшек A β в возрасте 5 месяцев, формируются в мозжечке и стволе мозга к 8-9 месяцам	Астроцитарный глиоз и активация микроглии в областях головного мозга вокруг бляшек.	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 3-5 месяцев, в тесте «Водный лабиринт Морриса» в возрасте 3 месяцев [50, 146, 432].
5XFAD (Tg6799)	Человеческий APP (Шведский, Флорида, Лондон); Человеческий PSEN1 (M146L, L286V)	Нейрональное накопление A β 1-42 в возрасте 1,5 месяца, отложение бляшек A β , глиоз в возрасте 2 месяцев	Значительная нейродегенерация и потеря нейронов.	Нарушение поведения в Y-лабиринте в возрасте 4-5 месяцев, в тесте «Водный лабиринт Морриса» в возрасте 4 месяцев, снижение интереса к социальному взаимодействию в возрасте 3-12 месяцев [440, 580, 586].

APP23 х PS1-R278I	Человеческий APP23 (шведский K651N, M652L); человеческий PSEN1 (R278I)	Бляшка A β в возрасте 6 месяцев	Астроцитоз.	Нарушение поведения в Y-лабиринте в возрасте 3-4 месяцев; отсутствие значимых нарушений в тесте «Водный лабиринт Морриса» [666].
TREM2-ВАС х 5XFAD	Человеческий APP (Шведский, Флорида, Лондон); человеческий PSEN1 (M146L, L286V)	Образуется меньше кортикальных бляшек в возрасте 7 месяцев по сравнению с линией 5XFAD	Повышенное разветвление отростков и экспрессия фагоцитарных маркеров в микроглии, ассоциированной с амилоидными бляшками; снижение дистрофических изменений нейритов.	Отсутствие когнитивных нарушений в контекстном тесте «Fear conditioning» на оценку эмоционального обучения и памяти [463].
3xTg-AD	Человеческий APP (шведский); человеческий PSEN1 (M146V); человеческий тау (P301L)	Бляшка A β в возрасте 6 месяцев	Синаптическая дисфункция и повышенная активация микроглии в возрасте 6 месяцев; деструкция тау-белка в возрасте 12-15 месяцев	Нарушение поведения в тесте «Водный лабиринт Морриса» и эмоциональной памяти в тесте «Fear conditioning» [89, 95, 581].

На сегодняшний день в различных экспериментальных исследованиях находят широкое использование около 50 генетических мышинных моделей, большая часть которых характеризуется гиперэкспрессией мутантного или человеческого дикого типа APP, являющегося родственным белку семейной формы болезни Альцгеймера [804].

Ценным преимуществом данной генетической модели является активное церебральное отложение бета-амилоида и наличие специфических симптомов заболевания. Например, у подавляющего большинства генетических моделей мышей, которые экспрессируют мутантный человеческий тип APP, наблюдается возраст-зависимое выраженное развитие когнитивной дисфункции, аналогичное пациентам с болезнью Альцгеймера [174]. В дополнение к этому, отмечается наличие дистрофических отростков нейронов, активации микроглии, реактивного астроглиоза и развития нейровоспаления, а также синаптической дисфункции и деструктивных изменений межклеточной коммуникации [426]. При этом только у незначительной части трансгенных животных выявлено образование нейрофибриллярных клубков, тем самым давая возможность выдвинуть гипотезу, согласно которой гиперэкспрессии APP у мышей недостаточно для более полного и точного воссоздания молекулярного патогенеза болезни Альцгеймера как у человека [615].

Важно подчеркнуть еще и то, что активное отложение бляшек бета-амилоида у данных трансгенных мышей в большей степени находится в зависимости не только от экспрессии одного или другого трансгена, но и от церебрального образования определенных вариантов бета-амилоида. Вследствие этого появляется необходимость использования иной стратегии, которая нацелена на повышение накопления бляшек бета-амилоида, которое заключается в объединении ряда мутаций, обуславливающих развитие семейной формы болезни Альцгеймера [146].

Кроме мутаций APP, ряд экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что мутации PSEN, из которых на данный момент

определено около 200, несомненно вносят существенный вклад в развитие семейной формы хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа [71]. Так, установлено, что мутации PSEN способствуют развитию деструктивных изменений γ -секретаза-опосредованного протеолиза APP, тем самым провоцируя образования большего количества амилоидогенных пептидов A β 1-42, что в свою очередь заметно увеличивает в головном мозге соотношение A β 1-42:A β 1-40. Примечательно, что у генетической мышинной модели с мутацией PSEN 1 или PSEN 2 на фоне ярко выраженной когнитивной дисфункций и нарушения поведения не обнаружено агрегации бляшек бета-амилоида в головном мозге, что в свою очередь может быть связано с отличием в последовательностях бета-амилоида между грызунами и людьми [590]. Однако у нескольких мышинных моделей с мутацией PSEN 1 была выявлена возрастная хроническая нейродегенерация, а также заметная дисфункция синапсов в CA1 области гиппокампа [377, 477].

Также важно обозначить, что так широко используемые для исследования амилоидной патологии и оценки эффективности лечения двойные трансгенные модели на мышах были разработаны с помощью скрещивания трансгенных линий APP и PSEN человека. Ценным качеством данной модели является наличие высокого уровня A β 1-42 и интенсивное образование амилоидных уже на ранней стадии развития заболевания [341].

Другим важным примером двойной трансгенной модели на мышах APP / PSEN1 является мыши линии 5xFAD (Tg6799), которые коэкспрессируют пять генных мутаций – три мутации APP и две мутации PSEN1 (APP K670N/M671L (Swedish) I716V + (Florida) + V717I (London) and PS1 M146L + L286V), связанных с ранним началом семейной формы болезни Альцгеймера [580]. Такая комбинация мутаций дает линии 5xFAD существенные преимущества по сравнению с другими мышинными моделями, такими как Tg2576, TgAPP23, PDAPP, 3xTg-AD и т.д., а именно, возможность практически исключительно образовывать A β 1-42 и ярко выраженное активное церебральное накопление A β 1-42 [580].

Интересно и то, что у мышей линии 5xFAD также выявлены дистрофические изменения в миелинизации аксонов в таких областях головного мозга, как СА1 зона гиппокампа, энторинальная кора и прелимбическая область. При этом внутринейрональное накопление А β 1-42 наблюдается уже в возрасте 1,5 месяцев, а дальнейшее отложение амилоидных бляшек и глиоз в глубоких кортикальных слоях и гиппокампе выявлен в возрасте 2 месяцев [218].

Более того у данной линии мышей в возрасте 3 месяцев был выявлен выраженный церебральный дисметаболизм глюкозы, особенно в обонятельной луковице, а в возрасте 4 месяцев снижение экспрессии синаптофизина, причем в большинстве отделов головного мозга, тем самым приводя к гибели нейронов и прогрессированию нейродегенерации [830].

Интересно, что линия 5xFAD явилась фундаментом для создания таких генетических моделей болезни Альцгеймера, как линия 5xFAD/Tg30 и 5xFAD/PS19, которые несут в себе довольно широкий набор мутаций, связанных со гиперэкспрессией мутантного тау-белка (APPK670N/M671L,I716V,V717I, PS1M146L, L286V, Tau(1N4R)P301S,G272V; APPK670N/M671L,I716V,V717I, PS1M146L, L286V, MAPTP301S, соответственно) [822].

Использование данных более сложных генетических моделей позволяет в значительной мере повысить степень проявления нейродегенеративных изменений, в частности, потери пирамидальных нейронов гиппокампа в отличие от базовой мышинной линии 5xFAD [328, 822].

Принципиально подчеркнуть, что использование генетических моделей на мышах позволяет как получить важные и ценные данные о новых методах терапии [191, 367], так и дает возможность более детально исследовать неврологические, поведенческие и когнитивные деструктивные изменения, присущие хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа [376].

1.3 Особенности развития нейродегенерации у животных с интрагиппокампальным введением бета-амилоида и животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия 5xFAD (Tg6799))

Болезнь Альцгеймера клинически характеризуется развитием когнитивных нарушений, в частности, дисфункцией памяти [411], а также необратимым снижением количества холинергических нейронов в переднем мозге и потерей синапсов, главным образом, в гиппокампе и коре головного мозга [682].

Многочисленные исследования болезни Альцгеймера в основном сосредоточены на гипотезе амилоидного каскада, которая постулирует, что характерное повреждение нейронов при прогрессировании заболевания частично объясняется изменениями метаболизма бета-амилоида [692]. Исследования показали, что бета-амилоид становится токсичным за счет образования олигомеров, что в конечном итоге приводит к отложению амилоидных бляшек, нейродегенерации и, как следствие, когнитивным нарушениям [243].

Мутации в генах, связанных с процессингом APP, приводят к развитию генетической формы болезни Альцгеймера (с ранним началом) [473], которая составляет лишь небольшую часть случаев заболевания. При этом спорадическая форма (с поздним началом) имеет место в 99% случаев [857], являясь многофакторной и сложной нейродегенеративной патологией, возникающей в результате взаимодействия генетических и экологических факторов риска.

Существует несколько экспериментальных моделей болезни Альцгеймера, которые включают генетические модели с использованием трансгенных мышей, а также моделирование посредством интрагиппокампальной инъекции бета-амилоида [627].

Важно понимать, что ни одна из существующих генетических моделей полностью не воспроизводит полный спектр заболевания, однако конкретные критические аспекты патологии могут быть экспериментально воссозданы на экспериментальных моделях грызунов [452]. Стоит отметить, что в результате генетической модификации APP трансгенные мыши имеют ряд общих нейropатологических признака, наблюдаемых и у человека, но, тем не менее, существуют и важные различия [214]. В подавляющем большинстве, у трансгенных мышей развиваются диффузные и фибриллярные отложения бета-амилоида, которые можно выявить путем окрашивания тиофлавином-S. При этом фибриллярные амилоидные бляшки часто окружены реактивными астроцитами и микроглией, а также дистрофическими нейритами. Более того, снижение синаптической плотности может наблюдаться в области, непосредственно примыкающей к фибриллярным отложениям. В некоторых случаях у трансгенных мышей с возрастом наблюдается умеренная гибель нейронов, но в то же время не развивается тяжелая атрофия, которая присутствует у человека. Кроме того, у трансгенных мышей при прогрессировании заболевания имеет место повышение уровня гиперфосфорилированного тау-белка, однако не происходит формирование нейрофибриллярных клубков, что в свою очередь наблюдается у человека [214].

Более того, наиболее очевидным отличием трансгенных моделей на животных от болезни Альцгеймера у человека является искусственный характер трансгенной технологии. У грызунов болезнь Альцгеймера не развивается. Это обусловлено тем, что концентрация бета-амилоида *in vivo*, как правило, находится в пиколярном диапазоне, тогда как в мозге человека с болезнью Альцгеймера его концентрация выражена в наномолях. Кроме того, бета-амилоид грызунов отличается от человеческого наличием трех других аминокислот (R5G, Y10F и H13R), что в свою очередь может предотвращать агрегацию амилоида. Поэтому введение одного из основных человеческих

генов, обуславливающих развитие болезни Альцгеймера – APP, PSEN1, PSEN2 и ApoE является обязательным для моделирования патологии у грызунов [230].

Одной из последних и, возможно, наиболее широко используемых моделей на основе модификации APP является трансгенная линия Tg6799, у которой выявлено формирование амилоидных бляшек уже в возрасте 2 месяцев [580]. Гибель нейронов в гиппокампе выражено наблюдается к 9-месячному возрасту, тогда как в неокортексе данный показатель варьируется в пределах 25-40% в возрасте от 9 до 12 месяцев [218, 379], что согласуется с отсутствием явной атрофии головного мозга.

Интересно, что у данной линии мышей накопление интранейронального A β 1-42 наблюдается еще до образования амилоидных бляшек, что, по-видимому, оказывает прямое влияние на последующее формирование амилоидных бляшек.

Кроме того, выраженные нарушения пространственного обучения и памяти наблюдаются уже в возрасте 2 месяцев в Y-лабиринте [580].

Интрагиппокампальная инфузия бета-амилоида представляет собой метод, включающий прямую инфузию олигомерных форм бета-амилоида в паренхиму головного мозга с использованием стереотаксической установки [382].

Выделяют ряд критериев, которые отражают обоснованность использования модели животных с инъекцией бета-амилоида. Во-первых, бета-амилоид следует вводить в относительно низких концентрациях (низкий диапазон нМ), чтобы максимально приблизиться к концентрации его в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера. При этом тип бета-амилоида также имеет значение, поскольку растворимые виды пептида, применяемые *in vivo*, могут быть менее эффективными по сравнению с агрегированным пептидом [256, 584]. Во-вторых, инъекцию пептида следует производить в четко определенную область головного мозга, отдельную от области анализа жизнеспособности нейронов, для того, чтобы минимизировать возможное прямое повреждение нейронов от воздействия введенного пептида.

В-третьих, степень астроглиоза в ответ на инъекцию бета-амилоида должна быть определена в непосредственной близости от нейрональной экспрессии, чтобы установить возможную корреляцию между астроглиальной и нейрональной активностью в условиях нейротоксического действия бета-амилоида.

Как правило, областью введения является CA1 субрегион гиппокампа [688], поскольку данная область головного мозга наиболее подвержена нейродегенеративным изменениям при развитии болезни Альцгеймера [103]. При этом стоит отметить, что фокус внимания также сосредоточен и на зубчатой извилине гиппокампа, которая, как считается, играет решающую роль в формировании ассоциативной памяти [195], и особенно уязвима для повреждений на ранних стадиях развития нейродегенерации альцгеймеровского типа [585]. Инфузия олигомерного $A\beta$ 1–42 в головной мозг животного является моделью *in vivo*, которая воспроизводит амилоидопатию и, как следствие, гибель нейрональных клеток [75, 381, 721]. Данный метод позволяет реплицировать увеличение пептида бета-амилоида в пространстве и во времени, предотвращая любые компенсаторные или побочные эффекты, которые могут возникнуть у трансгенных животных [382]. Однако несмотря на выше указанные преимущества, метод инъекции бета-амилоида имеет свои ограничения, а именно, модель может воспроизвести эффекты $A\beta$ 1–42 только в определенной области мозга, и более того, во время процедуры сама игла, используемая для введения $A\beta$ 1–42, вызывает повреждение в месте инъекции, приводя к дополнительной гибели клеток и глиозу [382].

В ряде исследований продемонстрировано развитие дефицита пространственного обучения и памяти, вызванного интрагиппокампальным введением агрегированного $A\beta$ 1-40 или $A\beta$ 1-42 у грызунов уже после несколько дней или одной недели оперативного вмешательства [383, 620, 833, 835, 837], что обусловлено снижением синаптической плотности и гибелью нервных клеток в гиппокампе и префронтальной коре [245, 609, 620, 677], а

также увеличением концентрации провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β [541] и активацией микроглии в гиппокампе [246].

Другой подход к моделированию нейродегенерации – это интрагиппокампальная инъекция растворимых олигомеров A β 1-42, являющихся мощными нейротоксинами, которые, как было продемонстрировано, вызывают у мышей снижение синаптической плотности, активацию микроглии и астроцитов, увеличение уровня TNF- α , интерлейкина-1 β и интерлейкина -6 в гиппокампе, что сопровождается ухудшением памяти [246, 462].

В целом, это указывает на то, что инъекционная модель на грызунах может не только демонстрировать нарушения в поведении, которые фиксируются и у пациентов с болезнью Альцгеймера, но также в некоторой степени воспроизводить бета-амилоид-индуцированные патологические особенности заболевания.

Важно отметить и то, что в отличие от моделирования болезни Альцгеймера путем инъекции бета-амилоида, трансгенная модель подразумевает большие затраты на ее создание, более длительное формирование амилоидных бляшек (до нескольких месяцев), и, как следствие, более позднее выявление бета-амилоид-индуцированных синаптических и поведенческих нарушений [220].

Напротив, при моделировании нейродегенерации путем интрагиппокампального введения бета-амилоида у мышей выявлено не только скопление амилоидных бляшек – общего признака, присущего семейной и спорадической форме, но и связанное с этим развитие когнитивных нарушений. Более того, важным преимуществом данной модели является ее управляемость, что позволяет исследователям контролировать концентрацию A β 1-42, одновременное развитие нейродегенерации у подавляющего большинства экспериментальных животных, проявляющееся, в частности, в нарушении поведения, что в свою очередь обеспечивает свободу в отношении

экспериментального дизайна и широкий спектр возможностей для исследователей [418].

Основная проблема, связанная с моделированием болезни Альцгеймера, заключается в том, что имеющиеся на сегодняшний день трансгенные модели имитируют только редкую генетическую форму с ранним началом развития заболевания, тогда как мышиная модель спорадической формы болезни Альцгеймера пока отсутствует. При этом у трансгенных мышей помимо развития только бета-амилоидной патологии, либо только тау-патологии, не проявляются в полной мере в сочетанном варианте другие патологические особенности нейродегенерации альцгеймеровского типа, в частности, церебральные сосудистые нарушения, воспаление, гибель холинэргических нейронов, сахарный диабет 2 типа, реактивный астроглиоз. Наличие только одного патогенетического фактора не может отражать всю сложность и многогранность патогенеза спорадической формы болезни Альцгеймера, характеризующейся поздним началом, и как следствие, имеет место отсутствие полной информации об инициации и прогрессировании заболевания.

Таким образом, для реализации задач исследования необходимо использовать несколько моделей, а именно, инъекционную, воспроизводящую острое токсическое действие бета-амилоида, и трансгенную модель, которая учитывает, что патогенез болезни Альцгеймера более тесно связан с хроническим воздействием, а не с внезапным возрастанием концентрации бета-амилоида в головном мозге, что в совокупности позволит более детально изучить потенциальные основные механизмы развития нейродегенерации.

1.4 Инсулин и инсулиноподобный фактор роста в головном мозге

Инсулин представляет собой пептидный гормон, состоящий из 51 аминокислотного остатка, с молекулярной массой 5808 Да. Инсулин

генерируется в β -клетках поджелудочной железы островков Лангерганса, а также в клетках головного мозга [4, 659].

Периферический инсулин, пересекая гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), создает более высокие концентрации в зрелых нейронах, церебральных микрососудах, а также в нейрональных клетках-предшественниках [855].

Инсулиноподобные факторы роста (IGF) представляют собой белки, имеющие почти сходную молекулярную структуру с инсулином и связываются как IGF-рецепторами, так и с рецепторами инсулина. Есть два подтипа IGF, а именно, IGF-1 и IGF-2, которые играют решающую роль в обмене веществ, росте и пролиферации клеток центральной и периферической нервной системы.

Известно, что инсулин, IGF-1 и IGF-2 оказывают ингибирующее действие на апоптоз в нейрональных клетках мозга путем связывания с рецепторами инсулина. Такие нейробиологические процессы, как нейромодуляция, нейротрофия, рост и выживание нейронов в значительной степени контролируются инсулином и IGF, регулируемыми физиологическую, биохимическую, клеточную и молекулярную активность [466].

Исследования также показали, что инсулин, а также IGF-1 регулирует метаболизм бета-амилоида и его клиренс [128, 491].

Так, установлено, что инсулин ингибирует деградацию бета-амилоида за счет активации инсулин-разрушающего фермента, участвующего в расщеплении бета-амилоида. Следовательно, нейродегенерация альцгеймеровского типа, которая характеризуется образованием и накоплением бета-амилоида, прямо или косвенно контролируется инсулином и IGF [272, 480, 689].

1.5 Церебральная инсулинорезистентность как патогенетический фактор развития нейродегенеративных заболеваний и метаболических нарушений

Церебральная инсулинорезистентность представляет собой выраженное снижение чувствительности клеток головного мозга к инсулину. Это может быть обусловлено нарушением активации инсулин-сигнального каскада, дисрегуляцией рецепторов инсулина, а также неспособностью рецепторов инсулина связывать инсулин в связи с нарушением их структуры. 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 [536]. В целом, это приводит к нарушению обмена веществ в ЦНС, что находит свое отражение в постепенно развивающемся нарушении поведения, процесса обучения и различных видов памяти – одни из важных особенностей нейродегенеративных и метаболических заболеваний [343] .

1.5.1 Инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера

Центральная метаболическая дисфункция является общепризнанным признаком болезни Альцгеймера, о чем свидетельствует церебральный дисметаболизм глюкозы, развитие которого возможно наблюдается за несколько лет до появления симптомов заболевания [7, 183, 712].

Кроме того, за последнее десятилетие получено достаточное количество доказательств взаимосвязи метаболических заболеваний и развития болезни Альцгеймера [6, 70, 570, 625]. Так, пациенты с инсулинорезистентностью,

сахарным диабетом 2 типа, гиперлипидемией, ожирением или другими метаболическими заболеваниями имеют повышенный риск развития болезни Альцгеймера и подобных состояний, в частности, сосудистой деменции [168, 199].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что инсулинорезистентность в головном мозге является важной особенностью болезни Альцгеймера и может играть фундаментальную роль в ее патогенезе [148, 343, 444] (рисунок 2).



Рисунок 2 – Нарушение передачи сигналов инсулина в головном мозге при болезни Альцгеймера (на основании литературных данных)

В центральной нервной системе инсулин является нейромодулятором, который участвует в выработке энергии, экспрессии генов, регуляции синаптической пластичности, а также оказывает положительное влияние на выживание нейронов [20, 229]. В ходе проведения доклинических исследований на животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера, а также клинических исследований выявлено нарушение регуляции передачи сигналов инсулина в головном мозге, называемое «инсулинорезистентностью головного мозга», что признано одним из ключевых факторов когнитивных нарушений и развития спорадической формы нейродегенерации альцгеймеровского типа [237, 693, 762].

Существуют различные молекулы, которые участвуют в передаче сигналов инсулина, при этом дисфункция этих молекул может приводить к нарушению регуляции инсулин/IGF-сигналикации, тем самым способствуя прогрессированию болезни Альцгеймера [22, 727].

Кроме того, согласно проведенным исследованиям, при болезни Альцгеймера наблюдается значительное уменьшение чувствительности инсулина к его рецепторам [264], что запускает каскад патологических реакций, включающих снижение активности фосфатидилинозитид-3 киназы (PI3K), протеинкиназы В (Akt-киназы) и усиление активности гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3beta), что индуцирует как гиперфосфорилирование таубелка, так и отложение бета-амилоида – двух основных патологических признака нейродегенерации альцгеймеровского типа [73]. Известно, что инсулин по PI3K / Akt-пути регулирует поглощение глюкозы через глюкозный транспортер GLUT и энергетический обмен в головном мозге [291]. Принимая это во внимание, индукция фосфорилирования PI3K / Akt и инактивация фосфорилирования GSK-3beta может оказать положительное влияние на ход течения заболевания [290].

Экспериментальное исследование показало, что церебральная инсулинорезистентность, нейровоспаление и окислительный стресс

способствуют увеличению токсичности бета-амилоида и образованию нейрофибриллярных клубков [499]. Кроме того, была установлена тесная взаимосвязь инсулинорезистентности с нейровоспалительным и окислительным стрессом при развитии болезни Альцгеймера [18, 242, 799].

Известно, что инсулинразрушающий фермент регулирует разложение как инсулина, так и бета-амилоида, при этом недостаток фермента способствует отложению бета-амилоида, а также гиперинсулинемии [236]. Показано, что инсулин ингибирует индуцированный бета-амилоидом апоптоз и нейродегенерацию [643], но в то же время в другом исследовании обнаружено, что повышенный уровень инсулина в головном мозге значительно снижает клиренс бета-амилоида, способствуя прогрессированию болезни Альцгеймера [703].

В ряде исследований установлено, что уровень инсулина в спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера значительно снижен [167, 276], однако эти данные не всегда находили свое подтверждение [266, 546, 589]. Banks W.A. и соавторы объяснили низкий уровень инсулина в спинномозговой жидкости за счет снижения транспорта инсулина через ГЭБ [77, 78], при этом хроническая гиперинсулинемия в плазме, часто встречающаяся у пациентов с болезнью Альцгеймера, нарушает транспорт инсулина в мозг [266, 500].

Интересен тот факт, что гиперинсулинемия в мозге увеличивает уровень бета-амилоида за счет конкуренции между инсулином и бета-амилоидом за инсулинразрушающий фермент [629].

Стоит отметить, что инсулин регулирует метаболизм как бета-амилоида, так и тау-белка посредством трех сигнальных каскадов, таких как фосфолипаза C, PI3K и митоген-активированную протеинкиназу (МАРК) [344, 415]. При этом, как было показано, у инсулин-нокаутных мышей острый дефицит инсулина способствует гиперфосфорилированию тау-белка с последующим образованием нейрофибриллярных сплетений, что является одной из ключевых отличительных патологических характеристик болезни Альцгеймера [680].

Более того, Tumminia A. и соавторы [784] выдвинули предположение, согласно которому, инсулинорезистентность в головном мозге может существовать как явление, независимое от периферической инсулинорезистентности и толерантности к глюкозе [104, 762], тем самым означая, что снижение чувствительности к инсулину в мозге имеет иные последствия, чем в периферических тканях. Недавно опубликованные данные показали, что периферическая резистентность к инсулину и глюкозе значимо не отличалась между мышами дикого типа с моделью физиологического старения и мышами линии APP / PS1 (генетическая модель болезни Альцгеймера), в то время как уровни фосфорилированного IRS1 были повышены в головном мозге мышей линии APP / PS1 [196].

Таким образом, церебральная инсулинорезистентность играет значимую роль в патогенезе болезни Альцгеймера и тем самым может подтверждать выдвинутую гипотезу о том, что болезнь Альцгеймера является нейроэндокринным расстройством, связанным с мозгоспецифическим нарушением инсулин-сигнальных механизмов, т.е. «диабет 3 типа» [401, 472].

1.5.2 Инсулинорезистентность – связь с сахарным диабетом 2 типа и болезнью Альцгеймера

За последние несколько десятилетий многочисленные исследования показали, что рецепторы инсулина и молекулы-компоненты инсулин-сигнального пути локализованы в различных областях головного мозга [274, 284]. Это убедительно доказывает решающую роль передачи сигналов инсулина в регуляции различных функций ЦНС, а именно, роста и восстановления нейритов, активации нейрональных стволовых клеток, выживания нейронов, синаптической пластичности, процессов обучения и памяти [283, 360, 720]. В связи с этим, нарушение инсулин-сигнализации и

метаболизма инсулина может способствовать развитию различных заболеваний головного мозга [735]. При этом растущее количество эпидемиологических и молекулярных данных в настоящее время предполагает тесную связь между сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа) и болезнью Альцгеймера, в которых резистентность к инсулину становится потенциально важной характеристикой патологического состояния [2, 60, 135, 505] (рисунок 3).



Рисунок 3 – Взаимосвязь сахарного диабета 2 типа и болезни Альцгеймера. Общие и отличительные симптомы (на основании литературных данных)

Как известно, СД 2 типа представляет собой хроническое заболевание, характеризующееся нарушением секреции инсулина, снижением

чувствительности клеток организма к его действию, а также активацией воспаления, что негативно сказывается на качестве и продолжительности жизни [15, 664]. Ряд исследований убедительно доказывает, что СД 2 типа является основным фактором риска снижения когнитивных функций. Так, у животных с моделью СД 2 типа, ассоциированного с ожирением, наблюдались ярко выраженные нарушения процессов обучения и памяти на фоне повышения уровня инсулина в плазме, а также лептина и кортикостерона, и значительного снижения уровня инсулин-зависимого глюкозного транспортера GLUT4 в плазматической мембране гиппокампа, тем самым предполагая, что нейроэндокринные и нейрохимические патологические изменения способствуют нарушению гиппокампально-зависимого поведения [821]. В другом исследовании у данных животных гиперинсулинемия привела к нарушению синаптической пластичности в гиппокампе, что в свою очередь негативно отразилось на процессе пространственного обучения и памяти [398]. Кроме того, у крыс со стрептозоцин-индуцированным СД2 типа выявлено снижение уровня инсулина, гипергликемия, повышение уровни кортикостерона, нарушение гиппокампального нейрогенеза, синаптической пластичности и процесса обучения [738]. В целом, это указывает на то, что прогрессирование СД2 типа сопровождается выраженными нарушениями нейро- и синаптической пластичности, что отражается снижением когнитивных функций.

Примечательно, что резистентность к инсулину является решающим фактором, который способствует развитию когнитивных нарушений [723], тогда как введение инсулина оказывает положительное действие на когнитивную функцию, о чем свидетельствует ряд исследований на грызунах [530, 734]. Так, результаты эксперимента *in vivo*, в котором инсулин вводили интрацеребровентрикулярно, указывали о существенном его влиянии на пространственную память, при этом низкие дозы инсулина не оказывали значимого эффекта на процесс обучения и память, тогда как более высокие дозы значительно улучшали эти показатели [307].

Клинические данные также подтверждают, что СД 2 типа инициирует развитие когнитивной дисфункции. Так, у пациентов с СД 2 типа выявлена атрофия головного мозга с локализацией деструктивных изменений в подкорковом веществе и коре головного мозга, что сопровождается снижением церебрального перфузионного давления и дисрегуляцией кровотока преимущественно в лобной и височной области головного мозга, что, в конечном итоге, приводит к выраженным когнитивным нарушениям [459].

Важно и то, что СД2 типа увеличивает риск развития болезни Альцгеймера примерно в 2 раза, при этом каждый десятый зафиксированный случай нейродегенерации альцгеймеровского типа среди лиц пожилого возраста в мире может являться последствием СД2 типа [5, 231]. Это объясняется тем, что данные хронические заболевания имеют несколько патофизиологических особенностей, приводящих к повреждению головного мозга, наиболее важными из которых являются нарушение чувствительности клеток к инсулину, накопление бета-амилоида, гиперфосфорилирование тау-белка, повреждение церебральных сосудов и нейровоспаление [59, 861]. Кроме того, стоит обратить внимание на биомаркеры нейродегенерации, а именно, нарушение структурно-функциональной целостности гиппокампа [325] и атрофия головного мозга [431], выявленные недавно при СД2 типа, что дает возможность предполагать о наличии риска развития болезни Альцгеймера на фоне имеющегося СД2 типа. Также показано, что взаимосвязь между СД2 типа и когнитивными нарушениями может быть обусловлена в первую очередь атрофией головного мозга, а не цереброваскулярными нарушениями, при этом атрофия возникает в тех же областях головного мозга, что и при болезни Альцгеймера [553]. Однако основные механизмы, связывающие СД2 типа и болезнь Альцгеймера, остаются до конца не ясными и находятся в области интересов большинства исследователей.

Важно отметить, что резистентность к инсулину является одним из основных факторов риска развития болезни Альцгеймера и общей

патологической особенностью пациентов с СД2 типа и нейродегенерацией альцгеймеровского типа [200, 724] (**рисунок 4**).

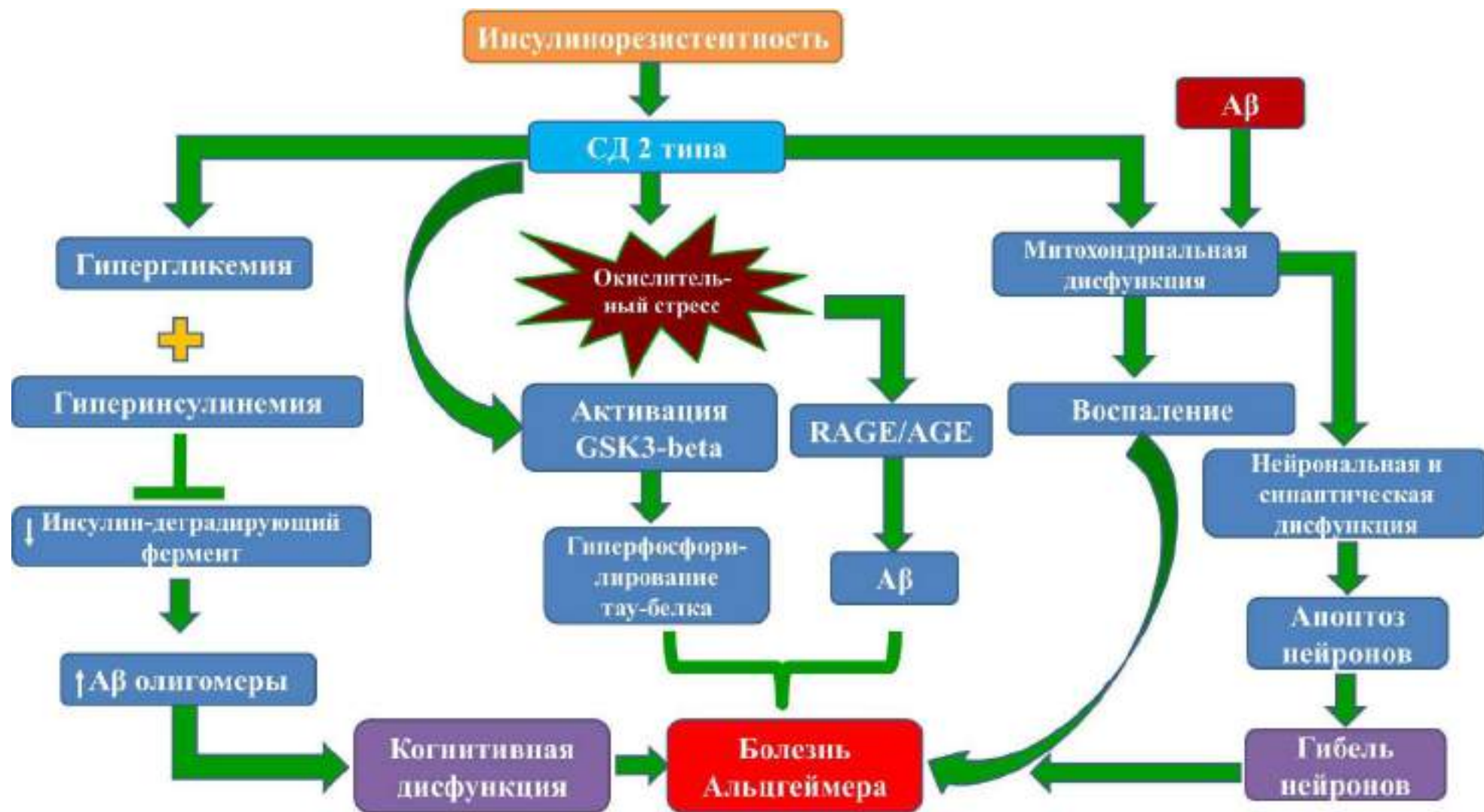


Рисунок 4 – Взаимосвязь инсулинорезистентности, сахарного диабета 2 типа и болезни Альцгеймера (на основании литературных данных)

Нарушение передачи сигналов инсулина в головном мозге приводит к снижению уровня Akt, что способствует увеличению активности GSK-3beta. Это вызывает гиперфосфорилирование тау-белка и, как следствие, образование нейрофибриллярных клубков [633]. Более того, периферическая гиперинсулинемия, как один из признаков СД2 типа, запускает в головном мозге каскад событий, включающий увеличение фосфорилирования рецептора инсулина по остатку тирозина, активацию MAPK и PI3K, и, в конечном итоге, фосфорилирование тау-белка [260]. Также показано, что у мышей, нокаутированных по IGF1 и IRS2 резко возрастает фосфорилирование тау-белка, тем самым доказывая, что генетическая делеция генов IGF1 и IRS2 специфически увеличивает фосфорилирование тау-белка за счет активации GSK-3beta [344, 683]. Это дает возможность утверждать, что инсулин/IGF1-сигнализация предотвращает церебральное гиперфосфорилирование тау-белка и последующее развитие нейрональной и синаптической дисфункции [684]. Учитывая, что СД2 типа характеризуется инсулинорезистентностью, гиперинсулинемией и нарушением передачи сигналов инсулина, логично предположить, что активация GSK-3beta при СД2 типа может привести к увеличению продукции бета-амилоида и гиперфосфорилированию тау-белка [630].

Стоит отметить, что как нейродегенеративные заболевания [13, 80], так и СД2 типа [10, 642] характеризуются нарушением целостности церебральных микрососудов и снижением мозгового кровотока.

Так показано, что у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается нарушение мозгового кровообращения, которое приводит к снижению снабжения головного мозга кислородом, глюкозой и питательными веществами [869], что частично опосредованно нарушением инсулин-сигнальной трансдукции. При исследовании микрососудов головного мозга животных с моделью СД2 типа выявлены выраженные негативные изменения в экспрессии генов, связанных с регуляцией ангиогенеза, вазоконстрикции и вазодилатации,

а также активации тромбоцитов [654]. Это указывает на то, что передача сигналов инсулина участвует в регуляции вазодилатации и вазоконстрикции [392]. Активация рецепторов инсулина опосредует вазодилатацию через PI3K / Akt-путь, при этом инсулин стимулирует эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), что приводит к выработке оксида азота (NO) и релаксации сосудов [392]. При развитии инсулинорезистентности наблюдается нарушение инсулин-сигнализации по PI3K / Akt-пути, что вызывает как снижение продукции NO и, следовательно, сужение сосудов, так и повышение продукции активных форм кислорода, тем самым способствуя активации окислительного стресса и воспаления. При этом увеличение уровня провоспалительных цитокинов и рекрутирование макрофагов в зону воспаления провоцирует развитие атеросклероза, что в конечном итоге приводит к макрососудистым осложнениям [406].

Известно, что активация воспаления в головном мозге вносит существенный вклад как в патогенез СД2 типа [9, 874], так и нейродегенеративных заболеваний [11, 798]. Действительно, у пациентов с болезнью Альцгеймера повышение уровня периферического инсулина приводит к увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов, а именно, интерлейкина-1, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α (TNF- α) в нейронах, астроцитах и амилоидных бляшках [716]. Также необходимо отметить, что при периферической резистентности к инсулину выработка воспалительных цитокинов и развитие воспаления может привести к фосфорилированию IRS1 по остатку серина через активацию ингибитора ядерного фактора «каппа-би», c-Jun N-терминальной киназы (JNK) и внеклеточной сигнал-регулируемой киназы 2 (ERK2), что нарушает инсулин-опосредованную передачу сигналов, блокируя внутриклеточное действие инсулина [873]. Возможно подобный механизм имеет место и в случае, когда олигомеры бета-амилоида активируют микроглию в головном мозге, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов, которые, связываясь с соответствующими рецепторами, индуцируют фосфорилирование IRS1 по

остатку серина [501]. Примечательно, что высокий уровень провоспалительных цитокинов в церебральных микрососудах, наблюдаемый как при СД2 типа, так и при болезни Альцгеймера, также может повлиять на передачу сигналов инсулина в головном мозге. При этом нарушение структурной целостности ткани церебральных сосудов может способствовать транспорту цитокинов через ГЭБ с последующей активацией фосфорилирования IRS1 [37, 675].

Воспаление в стенке церебральных сосудов может быть также опосредовано рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE), который экспрессируется в нейрональных клетках, астроцитах, микроглии и в эндотелиальных клетках головного мозга. Важно отметить, что как при СД 2 типа [8], так и при болезни Альцгеймера уровень RAGE значительно увеличен, что вероятно может являться одним из звеньев в сигнальном каскаде, приводящим к развитию сосудистой дисфункции [265, 504, 834]. Кроме того, корреляция между церебральным дисметаболизмом глюкозы, окислительным стрессом и накоплением RAGE играет важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера, тем самым способствуя прогрессированию заболевания [560]. Интересен и тот факт, что взаимодействие рецептора RAGE с бета-амилоидом обеспечивает транспорт последнего через ГЭБ [187], индуцируя цереброваскулярную дисфункцию, приводящую к гиперэкспрессии TNF- α и интерлейкина-6, что в конечном итоге способствует развитию синаптической дисфункции и нейродегенерации [618].

1.6 Роль инсулина в центральной нервной системе

Инсулин представляет собой пептидный гормон, секретируемый главным образом бета-клетками поджелудочной железы, участвующий в метаболизме глюкозы / липидов, регуляции сосудов и росте клеток [672, 867].

Ранее головной мозг считался инсулиннезависимым органом, на что указывал тот факт, что транспорт глюкозы в мозг и использование глюкозы большинством клеток мозга не зависят от инсулина. Кроме того, инсулин, вырабатываемый исключительно β -клетками поджелудочной железы островков Лангерганса, и, будучи высокомолекулярным белком, логично предположить, не мог пересечь ГЭБ. Однако собранные за последние десятилетия данные доказывают жизненно важную роль инсулина в ЦНС [173, 217, 80, 99, 149, 414].

Результаты ряда исследований указывали на то, рецепторы инсулина распределяются в определенных областях головного мозга (гипоталамус, гиппокамп, кора) [320, 321, 520], что коррелирует с участием инсулина в разнообразных специфических для того или иного региона мозга функциях: регуляция энергетического гомеостаза при локализации в гипоталамусе, когнитивные функции и память – в гиппокампе [865] (рисунок 5).

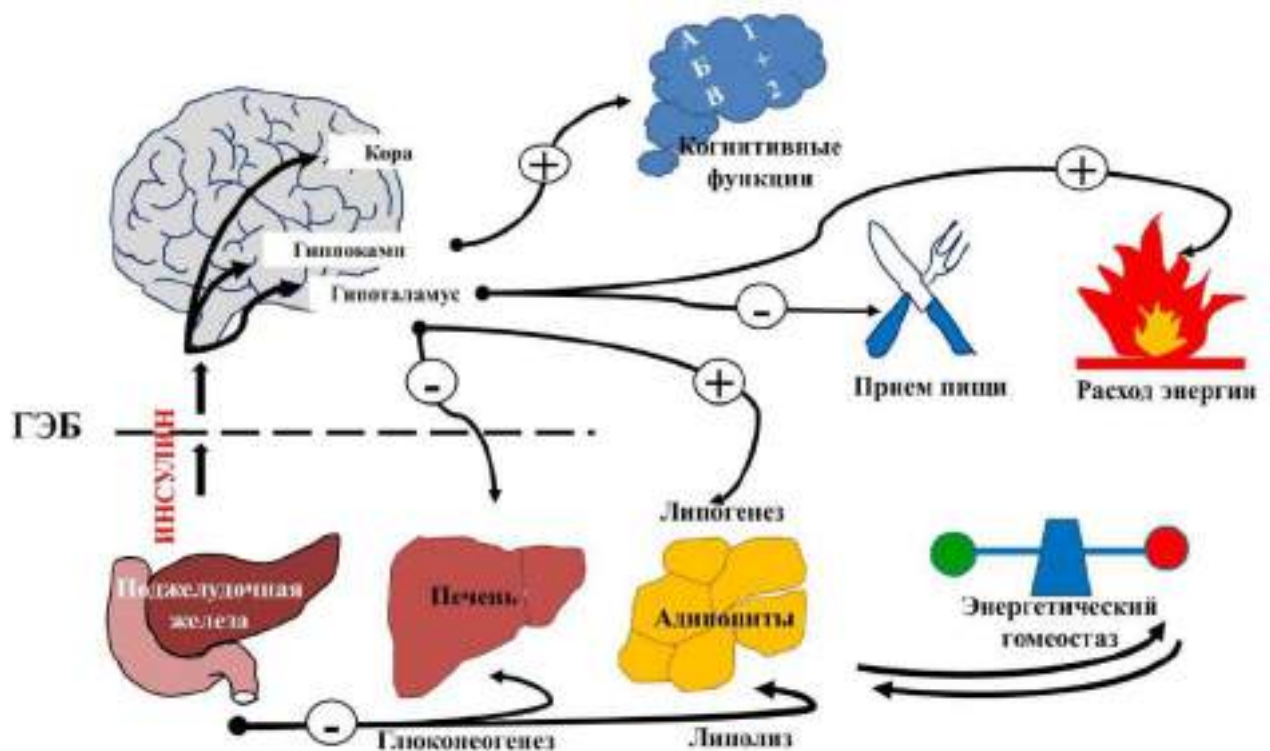


Рисунок 5 – Физиологические эффекты инсулина в ЦНС (на основании литературных данных)

Результаты исследования показали присутствие препроинсулина-I и его мРНК в аксонах, синапсах и дендритах мозга крысы [217], что приводит к синтезу инсулина в нейронах головного мозга. Кроме того, нейромодулирующее, нейротрофическое и нейропротективное действие в мозге регулируется инсулином, тем самым улучшая память и когнитивные функции [670, 851].

Обнаружено, что периферический инсулин достигает мозга посредством рецептор-опосредованной транспортной системы, присутствующей в ГЭБ [825]. Более того, некоторые области мозга (гипоталамус, сосудистое сплетение и т.д.) могут служить более быстрым местом проникновения периферического инсулина в ЦНС [83]. В течение некоторого времени считалось, что инсулиновый рецептор, присутствующий в эндотелиальной клетке головного мозга, опосредует этот транспорт. Эта гипотеза имеет свое основание, поскольку в регионах, где экспрессия рецептора инсулина является наибольшей, такие как обонятельная луковица [274, 685], соответственно, и транспорт инсулина наибольший [645]. Однако при этом не принимается во внимание, какое количество рецепторов инсулина присутствует в нейронах, астроцитах, перицитах и других типах клеток ЦНС в этих регионах головного мозга по сравнению с уровнями, присутствующими в эндотелиальных клетках. Поэтому наблюдаемый за последнее десятилетие рост использования метода секвенирования РНК позволяет получить информацию о характере экспрессии рецептора инсулина в различных типах клеток ЦНС и, в дальнейшем, выявить региональные различия между клетками [858]. Результаты исследований с использованием моделей транспорта инсулина *in vitro* [286] и *in vivo* [533], а также анализ церебральных микрососудов *in vivo* [254] дали возможность предположить, что рецептор инсулина отвечает за транспортировку инсулина через эндотелиальные клетки в головной мозг. Однако более поздние исследования с применением фармакокинетических методов *in vivo* на линии мышей, нокаутных по эндотелиально-специфическому рецептору инсулина, и использованием фармакологического ингибирования рецептора инсулина,

показали, что транспорт инсулина через ГЭБ при этом остается неизменным [645]. Кроме того, в рамках другого исследования с использованием эндотелиальных клеток и капилляров головного мозга крупного рогатого скота, крысы и мыши, было также подтверждено, что ингибирование рецептора инсулина не влияет на его транспорт через ГЭБ [332].

Тем не менее, как было показано Konishi M. и соавторами, системная стимуляция инсулином мышей с эндотелиально-специфической инактивацией гена рецептора инсулина вызывала замедленную передачу сигналов инсулина в скелетных мышцах, гипоталамусе, гиппокампе и префронтальной коре головного мозга, но не в печени и обонятельной луковице [435]. Кроме того, передача сигналов инсулина в эндотелиальных клетках оказывает положительное влияние на регуляцию тонуса сосудов головного мозга [800]. При этом стоит отметить, что избыток IGF-1 может ингибировать транспорт инсулина через ГЭБ, что, возможно, связано с конкуренцией за связывание с транспортером [852].

1.7 Влияние инсулина на структурно-функциональную целостность ГЭБ в норме и при болезни Альцгеймера

ГЭБ является компонентом нейроваскулярной единицы и действует как физиологический барьер между головным мозгом и кровеносной системой, опосредуя связь между ЦНС и периферией. В качестве главного структурного элемента ГЭБ выступают эндотелиальные клетки, расположенные монослоем вдоль церебральных кровеносных сосудов. При этом наличие плотных контактов между эндотелиальными клетками обеспечивает высокое трансэндотелиальное электрическое сопротивление и низкую параклеточную и трансклеточную проницаемость [19, 27].

Эндотелиальный монослой граничит с перипитами (в капиллярах) и гладкомышечными клетками кровеносных сосудов (в артериолах и артериях), а также с астроцитами. Важно отметить, что в отличие от высокопроницаемых капилляров системного кровотока, капилляры головного мозга характеризуются низкой объемной скоростью кровотока за счет трансцитоза, который вместе с плотно расположенными друг к другу эндотелиальными клетками, ограничивает проникновение большинства молекул крови, не имеющих специализированных транспортеров или рецепторов в эндотелии, в головной мозг [26].

Кроме того, различные типы клеток нейроваскулярной единицы, включая клетки кровеносных сосудов (эндотелий, перипиты, гладкомышечные клетки), глиальные клетки (астроциты, микроглия) и нейроны, способствуют регуляции проницаемости ГЭБ [370]. Сохранение целостности ГЭБ необходимо для поддержания постоянного химического состава спинномозговой жидкости, что в свою очередь играет решающее значение для правильного функционирования синапсов и нейронов. Напротив, повреждение ГЭБ приводит к увеличению проницаемости сосудов за счет уменьшения мозгового кровотока и нарушения гемодинамики, что в свою очередь способствует проникновению нейротоксичных веществ и микробных патогенов крови в головной мозг, тем самым инициируя развитие нейровоспаления и, как следствие, нейродегенеративных заболеваний [1, 755].

Как известно, рецепторы инсулина экспрессируются в различных типах клеток ЦНС. Так, у мышей экспрессия гена рецептора инсулина наиболее высока в эндотелиальных клетках, чем астроцитах и нейронах [858], тогда как в ткани головного мозга человека уровень экспрессии рецепторов инсулина распределяется равномерно между различными типами клеток [859]. Инсулин взаимодействует с рецепторами на клетках ГЭБ, а именно, нейронах [736] и глиальных клетках [269], эндотелиальных клетках [800] и перипитах [812], тем самым проявляя различные физиологические эффекты в ЦНС.

Транспорт инсулина через ГЭБ подтверждался много раз с использованием различных методов, включая перфузию [686], видоспецифические иммуноанализы [78] и новейший кинетический анализ [76]. Переносчиком инсулина в ГЭБ является не статический, а скорее динамический белок, регуляция которого напрямую зависит от текущего физиологического состояния организма. Фактически, в период наибольшего развития мозга, а именно, в неонатальный период, транспорт инсулина через ГЭБ и связывание его с эндотелиальными клетками головного мозга увеличивается по сравнению с взрослым периодом [254]. Уровни инсулина в спинномозговой жидкости и головном мозге также значительно выше в неонатальном периоде. Примечательно, что связывание инсулина с капиллярами головного мозга значимо выше у новорожденных кроликов по сравнению со взрослыми, что может быть обусловлено наличием более высоких уровней сайтов связывания инсулина. Стоит также отметить, что данные отличия между новорожденными и взрослыми кроликами, вероятно, связаны с митогенной природой действия инсулина в ЦНС, а не с его метаболической ролью [254].

Как известно, скорость транспорта инсулина через ГЭБ различна в зависимости от той или иной области головного мозга, которая испытывает потребность в инсулине. В течение некоторого времени считалось, что рецепторы инсулина, присутствующие в эндотелиальных клетках головного мозга, опосредуют этот транспорт. Эта гипотеза имеет определенную ценность, поскольку в областях, характеризующихся высокой экспрессией рецептора инсулина, в частности, обонятельной луковице [274], транспорт наиболее активный [645]. Однако при этом не стоит принимать во внимание количество рецепторов инсулина, локализующихся на нейронах, астроцитах, перицитах и других типах клеток ЦНС в этих областях мозга, и сравнивать их с уровнями, присутствующими в эндотелиальных клетках [645].

Результаты исследования с использованием транспортных моделей *in vitro* [286], а также анализы капиллярного связывания [421] и статические измерения транспорта *in vivo* [533] дают возможность предполагать, что

рецептор инсулина отвечает за физическую транспортировку инсулина в мозг через эндотелиальные клетки. Однако согласно недавно полученным экспериментальным данным с использованием динамических фармакокинетических методов *in vivo* на модели мышей с отсутствием рецептора инсулина в эндотелиальных клетках мозга, а также фармакологическим ингибированием рецептора инсулина, транспорт инсулина через ГЭБ не изменился [646]. Это также было подтверждено в другом исследовании с использованием эндотелиальных клеток головного мозга и капилляров крупного рогатого скота, крысы и мыши, в котором ингибирование рецептора инсулина не влияет на транспорт [332].

Важным моментом является и то, что различный уровень экспрессии переносчика инсулина в той или иной области головного мозга напрямую коррелирует с различием в транспорте инсулина. При этом гипотеза о том, что переносчик инсулина отделен от рецептора инсулина, имеет под собой весомые аргументы. Важный сигнальный пептид, такой как инсулин, должен иметь белок, с которым он может связываться и вызывать внутренний сигнальный каскад, в дополнение к наличию другого белка, который может транспортировать этот сигнальный пептид в другие области, необходимые для передачи сигналов инсулина (**рисунок 6**). Кроме того, эти отдельные белки должны иметь возможность регулироваться по-разному, в зависимости от физиологической потребности в любой момент времени. Так, передача сигналов рецептора инсулина в эндотелиальных клетках головного мозга передает сигнал нейронам [435], который, как известно, оказывает существенное влияние на рост и выживание. Кроме того, передача сигналов инсулина в эндотелиальных клетках играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса [800]. Поскольку эндотелиальные клетки создают барьер для других клеток внутри органов, было выдвинуто предположение о том, что данные клетки также могут содержать белок-переносчик для независимого транспорта инсулина к другим типам клеток и проявлению своего физиологического эффекта. Также вероятно, что переносчик инсулина

является довольно специфичным для инсулина, и регулируется аллостерическим образом.

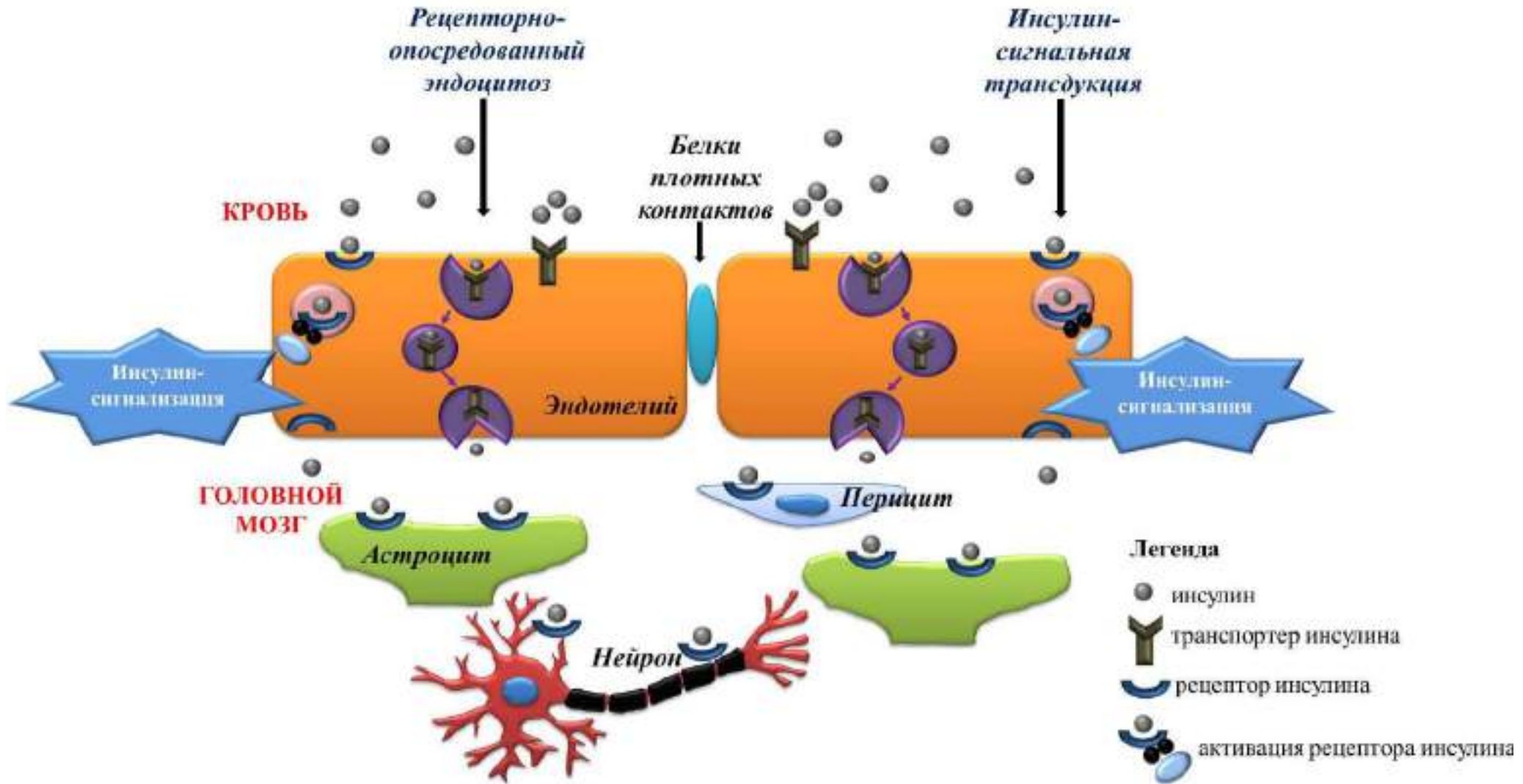


Рисунок 6 – Схема транспорта и передачи сигналов инсулина в клетках ГЭБ
(на основании литературных данных)

Стоит также отметить, что в ходе исследования линии мышей с эндотелиально-специфической инактивацией гена инсулинового рецептора выявлено снижение передачи сигналов инсулина в скелетных мышцах, гипоталамусе, гиппокампе и префронтальной коре головного мозга, увеличение проницаемости ГЭБ для декстрана в обонятельной луковице, а также уменьшение уровня экспрессии белков плотных контактов в гипоталамусе [435]. Кроме того, рецепторы инсулина, экспрессирующиеся на эндотелиальных клетках головного мозга, контролируют кинетику передачи сигналов инсулина в определенных областях мозга, таких как гиппокамп и гипоталамус, но не в обонятельной луковице. В целом, результаты свидетельствуют, что рецептор инсулина в эндотелиальных клетках оказывает избирательный эффект на передачу сигналов инсулина в зависимости от области мозга, а также регулирует экспрессию белков плотных контактов, тем самым поддерживая структурную целостность ГЭБ [435].

Известно, что нарушение мозгового клиренса бета-амилоида через ГЭБ вносит весомый вклад в прогрессирование болезни Альцгеймера [188, 702]. Инсулин может регулировать кинетику бета-амилоида в плазме и головном мозге, а также его транспорт через эндотелий ГЭБ, о чем свидетельствуют результаты одного из исследований, в котором внутривенное введение инсулина мышам дикого типа вызывало увеличение клиренса плазмы от $A\beta$ 1-40, и его транспорт из крови в головной мозг на фоне снижения клиренса и транспорта $A\beta$ 1-42 [752]. Однако в другом исследовании при интрацеребровентрикулярном введении инсулина крысам происходило ингибирование церебрального клиренса $A\beta$ 1-40, тогда как клиренс более токсичной изоформы бета-амилоида $A\beta$ 1-42 увеличивался [703]. Влияние инсулина на транспорт бета-амилоида через ГЭБ также было исследовано на мышцах с генетической моделью болезни Альцгеймера с сопутствующим ожирением [796], у которых внутривенная инъекция инсулина способствовала восстановлению церебрального уровня растворимого бета-амилоида на фоне

увеличения его концентрации в плазме. В дополнении к этому, внутривенное введение инсулина пациентам с болезнью Альцгеймера вызывало повышение его уровня в плазме, что в свою очередь способствовало и увеличению уровня бета-амилоида в плазме. Это дает возможность предполагать, что клиренс бета-амилоида через ГЭБ является процессом, посредством которого инсулин снижает его уровень в головном мозге, а нарушение этой регуляции могут способствовать прогрессированию болезни Альцгеймера [449].

Стоит отметить, что передача сигналов инсулина в астроцитах, экспрессирующих рецептор инсулина и другие компоненты инсулин-сигнального пути, регулирует синтез гликогена и пролиферацию клеток [326]. Интересно, что у мышей экспрессия генов рецепторов инсулина в астроцитах гиппокампа увеличивается с возрастом и достигает своего пика к 2 годам, экспрессируя при этом изоформу В рецептора инсулина [156]. Установлено, что нокаутирование у мышей гена рецептора инсулина, экспрессируемого в астроцитах, отрицательно влияет на морфологию астроцитов гипоталамуса, функцию митохондрий, а также потенцирование высвобождения дофамина и АТФ [119, 269]. Кроме того, нарушение передачи сигналов инсулина в астроцитах гипоталамуса снижает чувствительность нейронов к глюкозе [269], а также экспрессию глюкозного транспортера GLUT1, что способствует развитию aberrантного метаболизма глюкозы за счет уменьшения ее транспорта через ГЭБ, приводя в конечном итоге к прогрессированию нейродегенерации альцгеймеровского типа [820].

В другом исследовании у мышей со стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом I типа, ассоциированным с инсулинорезистентностью, выявлены деструктивные морфологические изменения астроцитов, что в конечном итоге приводит к нарушению структуры ГЭБ и повышению его проницаемости [669].

Важно отметить и то, что ингибирование рецептора инсулина увеличивает экспрессию в астроцитах белка APOE, который вовлечен в развитие болезни Альцгеймера [119]. В целом, эти данные свидетельствуют,

что инсулин может регулировать множество функций астроцитов, что в конечном итоге влияет на активность и выживаемость нейронов, а также синаптическую пластичность – ключевые процессы в обучении и памяти [57].

Примечательно, что у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия APP / PS1) скорость транспорта инсулина через ГЭБ в определенных областях мозга, включая гиппокамп, значительно больше по сравнению с мышами дикого типа, что, возможно, связано с запуском компенсаторного механизма в головном мозге при развитии болезни Альцгеймера, благодаря которому повышается проницаемость ГЭБ для инсулина [611]. В другом исследовании у пациентов с болезнью Альцгеймера выявлено повышение уровня инсулина в плазме на фоне выраженного его снижения в спинномозговой жидкости, что, вероятно, указывает на нарушение транспорта инсулина через ГЭБ в результате развития нейродегенерации [167].

Интересно, что согласно результатам недавно проведенного исследования, у людей с умеренными когнитивными нарушениями повреждение капилляров головного мозга и структуры ГЭБ в гиппокампе не коррелировало с изменениями уровней бета-амилоида и тау-белка – ключевых признаков развития болезни Альцгеймера, тем самым позволяя предположить, что нарушение целостности ГЭБ является ранним биомаркером когнитивной дисфункции [571].

Таким образом, ГЭБ представляет собой совокупность структурных, транспортных и метаболических барьеров, которые в комплексе ограничивают проникновение в ЦНС неспецифических молекул, тем самым обеспечивая доставку специфических веществ и контроль постоянства внеклеточной среды. Кроме того, ГЭБ как транспортная система для инсулина имеет решающее значение для взаимодействия между периферически секретируемым инсулином и его рецепторами, расположенными в различных типах клеток головного мозга, формирующих нейроваскулярную единицу. Это взаимодействие обеспечивает реализацию механизмов специфического связывания инсулина с бета-амилоидом и тау-белком, что особенно важно для лучшего понимания

патогенеза болезни Альцгеймера и его взаимосвязи с метаболическими нарушениями в головном мозге.

1.8 Роль рецептора инсулина в инсулин/ IGF-сигнализации в норме и при болезни Альцгеймера

Инсулин оказывает свое действие через связывание с рецептором инсулина (IR), который существует в двух разных изоформах (IR-A и IR-B). IR-A обнаружен в нервной системе взрослого человека и имеет более высокое сродство к инсулину, чем IR-B, который обнаруживается, главным образом, в жировой ткани, печени и скелетных мышцах [210, 614, 872]. Однако в недавнем исследовании Garwood C.J. и соавторы сообщали об экспрессии IR-B в астроцитах [271], с потенциальной ролью в опосредовании функции инсулина и инсулиноподобного фактора роста в ЦНС.

В головном мозге IR локализуется как в нейронах, так и глии, при этом избирательно распределяясь по всему мозгу с наибольшей концентрацией в ядрах коры, гиппокампе, гипоталамусе, миндалине и обонятельных луковицах [404, 520].

Инсулин, IGF-1 и IGF-2 активируют инсулиновый рецептор, который играет важную роль в механизмах выживания клеток, таких как дифференцировка, регуляция роста и метаболическая активность. Важно отметить, что IGF-1, IGF-2 также могут связываться с рецептором инсулина, но с меньшей аффинностью, чем инсулин [53, 503].

Инсулиновые рецепторы представляют собой тирозинкиназы с α - и β -субъединицами. При связывании инсулина с рецептором, α -субъединица способствует аутофосфорилированию остатков тирозина на β -субъединицах, что приводит к рекрутированию каркасных белков, в основном субстратов инсулинового рецептора 1 и 2 (IRS1 и IRS2), которые, в конечном итоге,

соединяют инсулин с двумя значимыми путями передачи сигнала: PI3K / Akt-путь, ответственный за метаболические эффекты, синтез липидов и белков, и MAPK(митоген-активированная протеинкиназа)/ERK(внеклеточные сигнально-регулируемые киназы)-путь, который модулирует рост клеток, выживание и экспрессию генов [427].

Кроме того, инсулиновый рецептор регулирует церебральный метаболизм глюкозы и оказывает ингибирующее действие на апоптоз в нейронах мозга через инсулин и IGF [587]. Так, установлено, что нарушение регуляции метаболизма глюкозы, опосредованное через инсулиновые рецепторы, способствует развитию болезни Альцгеймера [353]. Важно отметить, что бета-амилоид конкурирует с инсулином за связывание с IR, что нарушает IRS1/PI3K-сигнализацию, особенно на уровне IRS 1 [762]. Это приводит к снижению активности PI3K / Akt и увеличению уровня GSK-3beta, что в свою очередь способствует фосфорилированию тау-белка, а также усиленному отложению амилоидных бляшек – двух отличительных патологических признака болезни Альцгеймера [73] (**рисунок 7**).

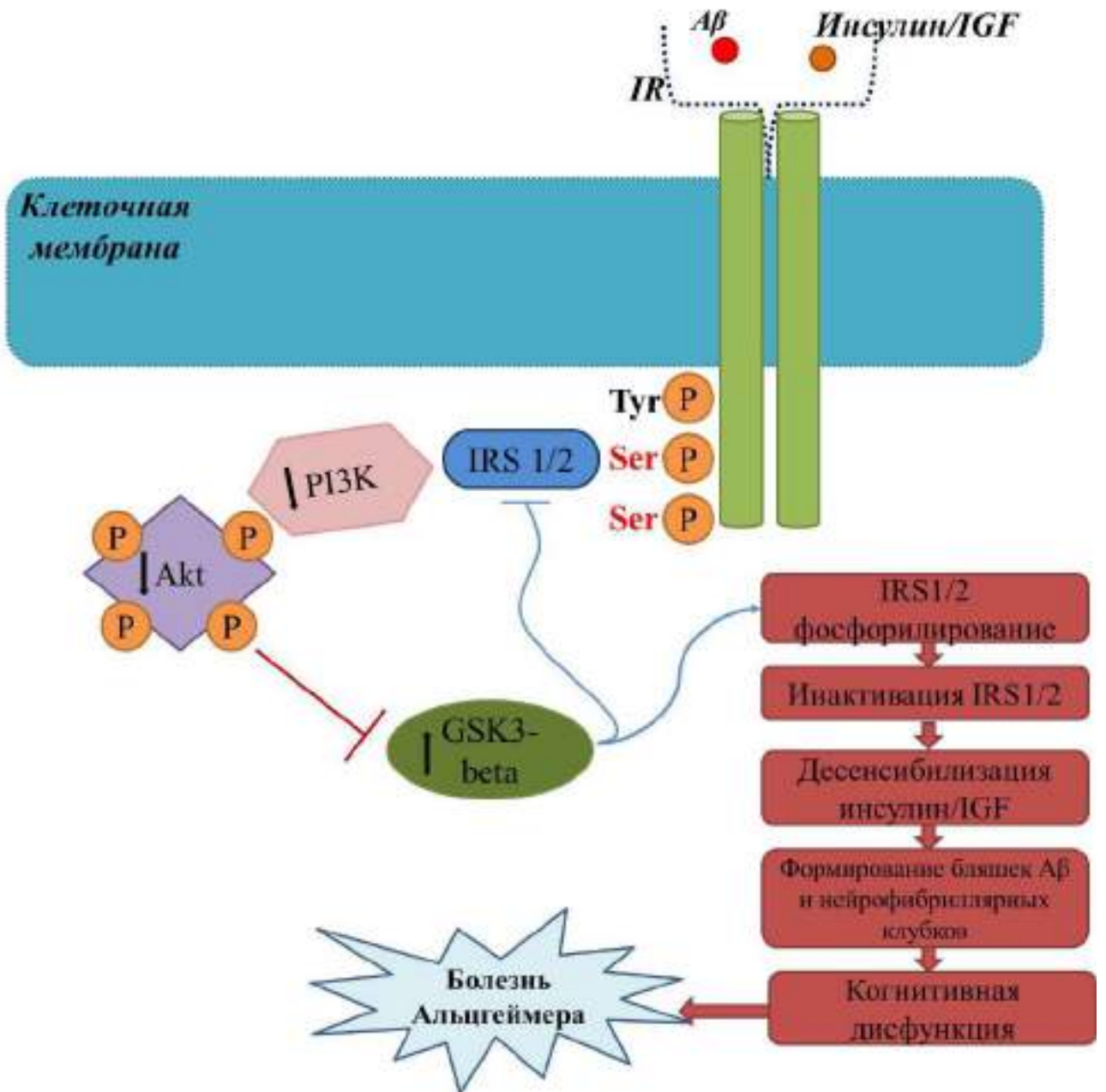


Рисунок 7 – Схема передачи сигналов инсулин/IGF в головном мозге при болезни Альцгеймера (на основании литературных данных)

1.9 Субстрат рецептора инсулина как важный лиганд в инсулин/IGF-сигнализации в норме и при болезни Альцгеймера

Субстраты рецептора инсулина (IRS) являются лигандными белками, которые играют роль в механизмах передачи сигналов инсулина и действуют как сигнальные адаптерные белки [106]. Субстраты, кодирующиеся IRS генами, классифицируются на IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, IRS5 и IRS6 [190]. При этом, из всех перечисленных субстратов важным является IRS1, который совместно с IGF-1 играют основную роль в механизме передачи сигналов инсулина. IRS, выступая в качестве платформы взаимодействия, связываются с фосфорилированными по тирозину доменами инсулиновых рецепторов, что приводит к активации IRS за счет их фосфорилирования, а далее IRS передает сигнал следующим сигнальным белкам каскада инсулинового рецептора для распространения стимула внутри клетки [313].

В ряде исследований сообщалось, что у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдалось снижение уровней IRS1 и IRS2 [548, 762], что указывает на весомую роль IRS в развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа. Также в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдалась пониженная экспрессия генов IRS1 и IRS2, что коррелировало с прогрессированием нейродегенеративного процесса [261]. Кроме того, выявлено и повышенное фосфорилирование IRS1 по остаткам серина³¹² и серина⁶¹⁶, что указывает на взаимосвязь IRS1 и образование гиперфосфорилированного тау-белка [548].

В другом исследовании Vomfim et al. обнаружили, что олигомеры бета-амилоида могут активировать фактор некроза опухоли α / c-Jun N-терминальную киназу, индуцировать фосфорилирование IRS1 по остаткам серина и ингибировать физиологическое фосфорилирование IRS1 по остаткам тирозина в зрелых культивируемых нейронах гиппокампа. Нарушение передачи

сигналов IRS1 наблюдалось и у мышей линии APP / PS1 (генетическая модель болезни Альцгеймера), а также у обезьян *Сynomolgus* после интрацеребровентрикулярного введения олигомеров бета-амилоида [104].

Таким образом, ингибирование фосфорилирования IRS1 по остаткам серина, и, напротив, индукция фосфорилирования IRS1 по остатку тирозина, способствует активации PI3K / Akt-пути, что возможно, может оказать положительное влияние на ход развития заболевания [122].

1.10 Инсулин-регулируемый сигнальный путь в головном мозге и его роль в развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа

Передача сигналов инсулина играет важную роль в росте нейронов, развитии синапсов, энергетическом обмене, митогенезе, ингибировании апоптоза и т.д. Инсулин связываясь с α -субъединицей рецептора, индуцирует фосфорилирование тирозинкиназы β -субъединицы, что в свою очередь активирует ряд сигнальных путей [817] (**рисунок 8**).

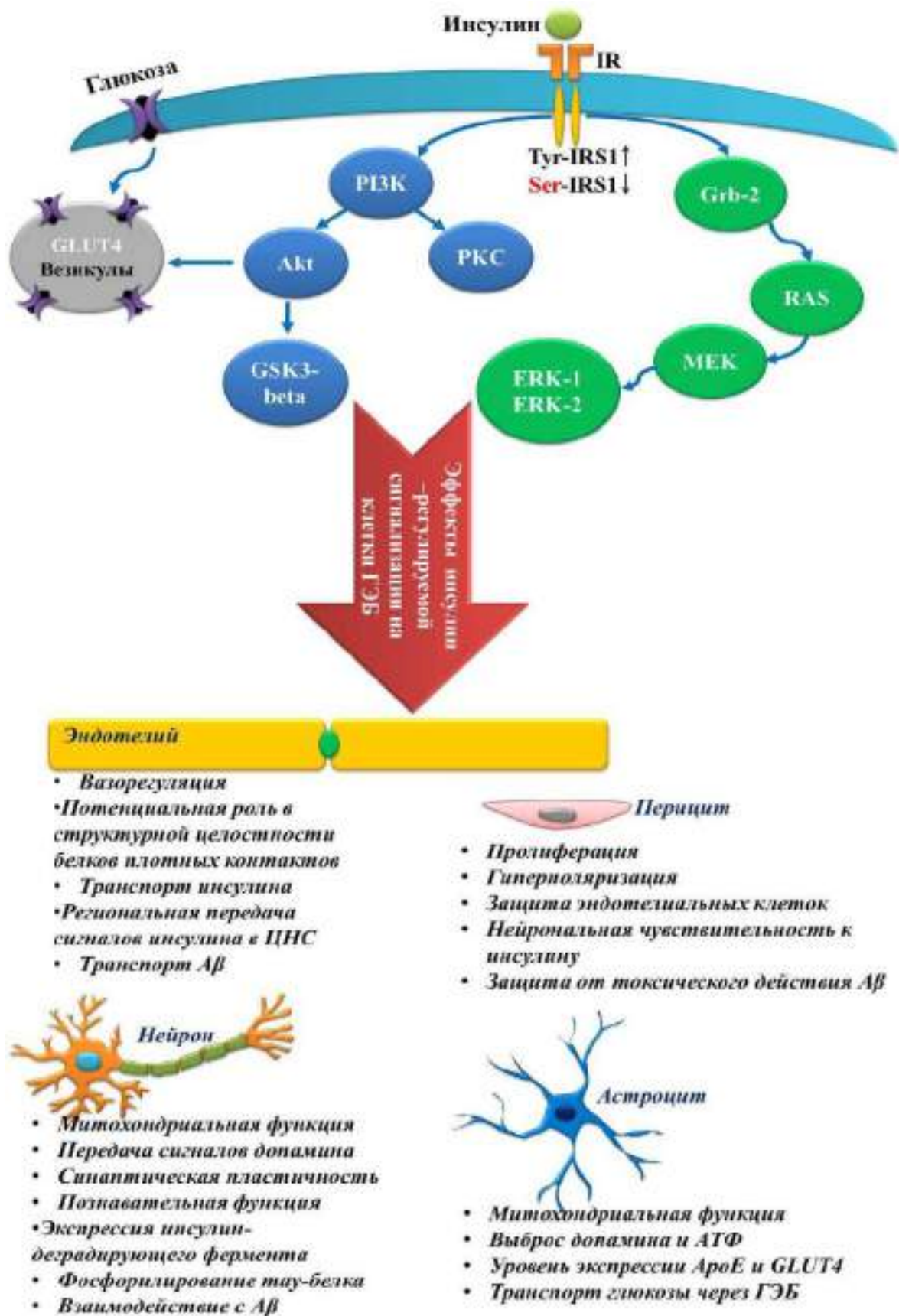


Рисунок 8 – Физиологическая роль передачи сигналов инсулина в клетках головного мозга (на основании литературных данных)

1.10.1 PI3K-Akt-сигнальный путь

Инсулиновый рецептор и рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, принадлежащие к семейству рецепторных тирозинкиназ, являются основными активаторами PI3K [470]. Связывание с инсулином приводит к конформационному изменению рецептора инсулина, вызывая его аутофосфорилирование с последующим рекрутированием внутриклеточных белков субстрата рецептора инсулина, которые впоследствии фосфорилируются тирозином. Как известно, фосфорилирование специфических остатков тирозина активирует субстрат инсулинового рецептора, однако существуют сайты фосфорилирования серина, которые инактивируют его, вызывая диссоциацию субстрата и снижая фосфорилирование тирозина [162]. Тирозин-фосфорилированный IRS активирует PI3K, что в свою очередь приводит к индукции Akt, которая отвечает за инактивацию GSK-3beta. Этот каскад событий регулирует синтез белков, участвующих в церебральном метаболизме глюкозы, а также подавляет индукцию апоптоза, тем самым способствуя выживанию нейронов [235].

Также было обнаружено, что гиперэкспрессия конститутивно-активного GSK-3beta способствует гибели нервных клеток, в то время как его ингибирование предотвращает апоптоз [217]. Другими известными молекулами, на которые нацелена передача сигналов инсулина по PI3K / Akt-пути, являются FoxO3 (Forkhead/winged helix box gene, group O), транскрипционный фактор NF-κB (ядерный фактор «каппа-би», nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) и цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREB (cAMP response element-binding protein). Фактически, Akt также может фосфорилировать и ингибировать FoxO3, предотвращая нарушение потенциала мембраны митохондрий и высвобождение цитохрома C, тем самым способствуя выживанию нейронов [160, 324]. Было показано, что фосфорилирование NF-κB с помощью Akt

ингибирует окислительный стресс и апоптоз путем повышения экспрессии супероксиддисмутазы [160, 217]. Кроме того, взаимодействие Akt с транскрипционным фактором CREB способствует стимуляции метаболизма глюкозы в нейронах, повышению потенциала мембраны митохондрий и уровня АТФ, а также окислительно-восстановительного состояния никотинамидадениндинуклеотид-фосфата (НАДФН) и активности гексокиназы [327].

Однако при развитии болезни Альцгеймера наблюдаются патологические изменения в передаче сигналов по PI3K-Akt-пути, что в первую очередь проявляется в снижении фосфорилирования и уровня отдельных компонентов в сигнальном каскаде инсулин-PI3K-Akt [487, 727].

Как показали исследования, олигомеры бета-амилоида ингибируют PI3K-Akt- путь, что приводит к гибели нейронов. Посмертный анализ различных областей мозга пациентов с болезнью Альцгеймера выявил снижение уровня инсулина, IR, IGF1 и его рецептора IGF1 [487, 727]. Кроме того, анализ образцов головного мозга показал как снижение уровня PI3K, так и снижение фосфорилирования Akt на фоне гиперэкспрессии GSK-3beta [548, 727]. Интересно, что эти изменения были связаны с несколькими важными патологическими признаками нейродегенерации альцгеймеровского типа, такими как скопление нейрофибриллярных клубков, а также повышение уровня маркеров глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и транскриптов мРНК микроглии [650].

Как известно, передача сигналов по PI3K-Akt-пути регулирует активность GSK-3beta путем фосфорилирования остатка серина, тем самым ингибируя GSK-3beta, которая является одной из наиболее важных тау-фосфорилирующих киназ [524].

Было показано, что в культивируемых нейронах инсулин и IGF1 снижают фосфорилирование тау-белка за счет Akt-опосредованного ингибирования GSK-3beta [344].

В другом исследовании Talbot К. и соавторы подвергли ткани гиппокампа животных из группы с болезнью Альцгеймера и контрольной группы стимуляцией инсулина физиологическими дозами *ex vivo*. При этом в группе контроля наблюдалось ярко выраженная реакция молекул-компонентов PI3K-Akt-пути на действие инсулина, что измерялось по усиленному фосфорилированию IRS1, Akt, GSK-3alpha и GSK-3beta. Напротив, в ткани гиппокампа животных с болезнью Альцгеймера выявлено резкое снижение опосредованной инсулином нисходящей активации [762].

Интересно, что два отдельных независимых исследования показали аномальные уровни фосфорилирования белков базальной мембраны в инсулин-IRS1-Akt-сигнальном пути в ходе посмертного анализа ткани головном мозга пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, эти изменения положительно коррелировали с повреждениями головного мозга в результате отложения амилоидных бляшек и формированием нейрофибриллярных клубков, и отрицательно с показателями памяти и общего когнитивного развития. Важно отметить, что инсулинорезистентность в гиппокампе способствовала усугублению повреждения головного мозга независимо от когнитивных нарушений [104, 762].

1.10.2 MAPK-сигнальный путь

MAPK-путь является важной сигнальной системой, которая опосредует клеточные ответы, и участвует во многих физиологических процессах, таких как рост, развитие, деление и гибель клеток, а также синхронизация клеточных функций [749, 767]. У млекопитающих выделяют следующие основные MAPK-пути: ERK1 / 2, ERK5, p38 MAPK и JNK [457].

Так, связывание инсулина с его рецептором вызывает фосфорилирование IRS1, что приводит к активации ERK1 / 2, тем самым внося значительный вклад в пролиферацию и дифференцировку клеток [67].

Также обнаружено, что регуляция транскрипции генов инсулина и IGF1 производится посредством MAPK-пути. Активированный инсулин и IGF1 облегчают связывание IRS1 с доменами SH2 адапторного белка Grb-2 (ростовой фактор рецептор-связывающего протеина 1), что приводит к активации малого G-белка RAS, а затем MEK (активируемая митогеном протеинкиназа киназа), который дополнительно активирует ERK-1 и ERK-2 [261].

Кроме того, ERK, связываясь с транскрипционным фактором CREB, активирует его, что в свою очередь запускает BDNF-индуцированное долгосрочное потенцирование в синапсах зубчатой извилины гиппокампа [632]. Активация RAS-MAPK-пути, связанного с транскрипционным фактором CREB, увеличивает транскрипцию некоторых специфических генов, играющих роль в выживании нейронов [359].

Такие сигнальные молекулы, как p38MAPK и JNK в основном активируются при стрессе и играют роль в торможении роста, воспалении и проапоптотической передаче сигналов. При этом JNK активируется клеточным стрессом [871], тогда как p38 MAPK, первоначально именуемая «стресс-активируемая протеинкиназа», активируется в ответ на широкий спектр вредных внеклеточных стимулов (осмотический стресс, провоспалительные цитокины, тепловой шок) [124, 176]. Немаловажным является и участие p38 MAPK в регуляции таких значимых клеточных функций, как экспрессия генов, пролиферация, митоз, выживание клеток, дифференцировка и апоптоз [601]. Известны 4 подтипа p38 MAPK – это α , β , γ и δ подтипы, при этом первые два являются наиболее распространенными, экспрессируются на нейронах в различных областях мозга и активируются с помощью различных медиаторов во время окислительного стресса, ишемии и в ответ на действие провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкина-1 β (IL-1 β) и TNF- α

[311]. p38 MAPK имеет решающее значение во внутриклеточной сигнальной трансдукции для активации микроглии, а также в нейрональном ответе на действие нейротоксичных молекул при глиозе [193]. Помимо этого, p38 MAPK играет непосредственную роль в эксайтотоксичности глутамата [526], способствует $A\beta$ 1-42-опосредованной активации микроглии, ослабляет фагоцитоз бета-амилоида [207], активирует транскрипционный фактор CREB, и предотвращает рост нейритов в ответ на стресс [402]. Между тем, благодаря MSK1 (митоген- и стрессактивируемая киназа 1), которая регулирует транскрипцию генов посредством фосфорилирования как CREB, так и гистона H3, p38 MAPK способна модулировать синаптическую пластичность [165], что указывает на важную роль MSK1 в регуляции нейрональной пластичности в гиппокампе, а также выживании нейрональных клеток-предшественников в гиппокампе и коре [405].

Обнаружено, что основные признаки болезни Альцгеймера, такие как эксайтотоксичность, синаптическая дисфункция и скопление нейрофибриллярных клубков, связаны с ключевыми сигнальными компонентами MAPK-пути. Так, показано, что при развитии болезни Альцгеймера гиперфосфорилирование тау-белка опосредуется несколькими киназами, включая JNK, p38- MAPK и ERK [809]. Согласно результатам другого исследования [564] с использованием нетрансгенных крыс линии OXYS с ускоренным старением, у которых выявлены нейродегенеративные изменения, имеющие сходство с характерными признаками спорадической формы болезни Альцгеймера [728], прогрессирование заболевания обусловлено активацией ERK1 / 2-сигнального пути. При этом продолжительное лечение митохондриально-направленным антиоксидантом пластохинонил-децилтрифенилфосфоний (SkQ1) вызывало ингибирование сигнального пути MEK1 / 2-ERK1 / 2 в гиппокампе исследуемых животных, что дает основание рассматривать его в качестве потенциального терапевтического вещества для лечения нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Более того, при изучении экспрессии генов (CryaB и фосфо- (p-) Ser59-CryaB), участвующих в сигнальном пути p38-МАРК в префронтальной коре головного мозга крыс линии OXYS на разных стадиях развития болезни Альцгеймера продемонстрировано, что развитие заболевания сопровождается активацией p38 МАРК-зависимого фосфорилирования CryaB и выраженными изменениями сигнального пути p38-МАРК. При этом увеличение уровня p-Ser59-CryaB и его колоколизация с бета-амилоидом может быть интерпретировано как ответная реакция на накопление белковых агрегатов, тем самым выступая в качестве важного звена в эндогенном механизме развития болезни Альцгеймера [563].

В дополнении к этому, считается, что окислительный стресс, как один из ключевых факторов риска развития болезни Альцгеймера [619], вызван образованием активных форм кислорода, таких как гидроксильный радикал, супероксид-анион и перекись водорода, и является типичным активатором сигнальных молекул JNK и p38МАРК при нейродегенерации [298]. Считается, что активированные сигнальные молекулы, в частности, JNK, МАРК-сигнального пути способствуют развитию болезни Альцгеймера посредством различных механизмов, включая индукцию апоптоза нейронов [318], транскрипционную и ферментативную активацию β - и γ -секретаз [700], а также фосфорилирование и стабилизацию APP [161]. В дополнении к этому, активация JNK фосфорилирует IRS1 по остаткам серина, что блокирует передачу сигналов инсулина и способствует резистентности к этому гормону [842]. В другом исследовании *in vivo* показано, что активация p38МАРК медиаторами нейровоспаления способствует нарушению пространственной памяти и развитию церебральной инсулинорезистентности [372].

Таким образом, собранные данные свидетельствуют о существенном вкладе МАРК-сигнального пути в патогенез болезни Альцгеймера посредством регуляции апоптоза нейронов, активности β - и γ -секретазы и фосфорилирования APP и тау-белка.

1.10.3 Инсулин и церебральный метаболизм глюкозы

Одним из механизмов, посредством которых инсулин может влиять на когнитивные функции, является воздействие на энергетический обмен головного мозга. Важность глюкозы в ЦНС обусловлена более высокой скоростью метаболизма в мозге относительно большинства органов и тканей. Несмотря на то, что мозг составляет только 2% от средней массы тела, он использует около 25% глюкозы и 20% кислорода для протекания энергетического обмена [64, 88]. Энергия, образующаяся в результате метаболизма глюкозы, используется для поддержания градиента электрохимического потенциала ионов на плазматической мембране нейронов, а также ремоделирования клеточной мембраны липидов [64].

Инсулин, несомненно, имеет решающее значение для периферического метаболизма в жировой ткани, печени и скелетных мышцах [340, 461, 672]. До недавнего времени метаболизм глюкозы в головном мозге считался инсулиннезависимым. Тем не менее, недавние исследования выявили важную роль инсулина не только в периферическом, но и церебральном метаболизме [83, 98]. Так, Bingham E.M. и соавторы [96] сообщили об увеличении церебрального метаболизма глюкозы после восстановления базальных уровней инсулина у метаболически здоровых участников, при этом данные изменения были наиболее заметны в области коры. Это указывает на то, что нормальные базальные уровни периферического инсулина могут играть важную роль в поддержании церебрального метаболизма глюкозы.

В другом исследовании с использованием позитронно-эмиссионной томографии у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе выявлено увеличение метаболизма глюкозы после процедуры гиперинсулинемического зажима [336]. Интересно отметить, что гиперинсулинемическое состояние у метаболически здоровых участников не повлияло на метаболизм глюкозы. Эти результаты подтверждают мнение, что инсулин может модифицировать

церебральный метаболизм глюкозы, и эти эффекты могут различаться в зависимости от метаболического статуса [336].

Важно отметить и то, что инсулин, вероятно, может оказывать влияние на метаболизм глюкозы в головном мозге за счет локализованного распределения переносчиков глюкозы GLUT [24, 391, 635]. Существует 8 подтипов переносчиков глюкозы: GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT6, GLUT7 и GLUT8, которые экспрессируются в нейронах и глии [91]. Традиционно считалось, что инсулиннезависимые GLUT1 и GLUT3 являются единственными церебральными переносчиками глюкозы [469]. GLUT1 имеет две изоформы и более гликозилированная изоформа GLUT1 облегчает транспортировку глюкозы через ГЭБ [561]. Переносчик GLUT2 локализован на нейронах гипоталамуса и действуют как сенсор глюкозы, регулирующий потребление пищи. В нейронах гиппокампа GLUT2 регулирует высвобождение нейротрансмиттеров и синаптические функции [443]. Переносчик GLUT3, обнаруженный в различных регионах головного мозга, обладает почти в 5 раз большей способностью транспортировки глюкозы к мембране, чем GLUT1. Такие транспортеры, как GLUT4 и GLUT8, локализованные в определенных областях мозга, а именно, гиппокампе, мозжечке, коре, гипоталамусе и гипофизе, являются инсулин чувствительными, и соответственно, регулируются инсулином [110, 219, 490, 696]. Важно, что GLUT4 и GLUT8 локализуются в тех областях мозга, в которых экспрессируется инсулин и инсулиновые рецепторы [56, 321]. При этом GLUT4 считается основным чувствительным к инсулину транспортером, играющим значительную роль в транспорте внеклеточной глюкозы внутрь чувствительных к инсулину клеток [239]. Также обнаружено, что инсулин увеличивает экспрессию и транслокацию церебрального GLUT4 в гиппокампе [610].

С другой стороны активация провоспалительных цитокинов, а также резистентность к инсулину, приводит к снижению концентрации GLUT4, при этом снижение экспрессии гена GLUT4 коррелирует с инсулинорезистентностью, которая является основной характеристикой

сахарного диабета 2 типа [59], и согласно результатам многочисленных исследований приобретает потенциально важную роль в развитии болезни Альцгеймера [781].

Необходимо отметить, что переносчики GLUT в головном мозге играют важное значение как для поддержания гомеостаза глюкозы, производства энергии, так и для выживания нейронов [534].

Глюкозочувствительные нейроны и астроциты обнаружены во многих областях головного мозга, но в большей степени присутствуют в гипоталамусе и стволе мозга [269, 732]. Независимо от вовлеченных областей, чувствительные к глюкозе нейроны подразделяются на нейроны, возбуждаемые глюкозой, и нейроны, подавляемые глюкозой, тем самым повышая или снижая скорость их возбуждения в гипергликемических или гипогликемических условиях, соответственно. Механизмы, с помощью которых нейроны, возбуждаемые глюкозой, чувствуют ее, разнообразны, что зависит от типа экспрессируемых транспортеров глюкозы, а также от наличия или отсутствия АТФ-чувствительных К-каналов и глюкокиназы, как основного сенсора глюкозы [732].

Важным моментом является тот факт, что снижение уровня глюкозы в нейронах, как одного из ключевых веществ для сохранения структурно-функциональной целостности нервных клеток, способствует развитию нейродегенерацию [741].

Причины нейрональной дисфункции при нейродегенеративных расстройствах были предметом обширных исследований. Нормальное функционирование синапсов требует множества скоординированных механизмов, включая генерацию продуктов генов, ответственных за образование и поддержание мембранных комплексов; синтез и доставку мРНК, белков и трансммиттеров; регуляцию переноса, высвобождения и обратного захвата пузырьков и др. [182]. Чтобы все эти действия выполнялись эффективно, необходимо наличие достаточного количества энергетических субстратов. В мозге свободная энергия, необходимая для запуска большинства

клеточных реакций, происходит в результате фосфорилирования аденозин-5'-трифосфата, который в основном вырабатывается в митохондриях в ходе окисления глюкозы в аэробных условиях [870].

Поскольку глюкоза поглощается нейронами и астроцитами [201, 269, 495, 875], считается, что дисметаболизм глюкозы в головном мозге отражает снижение активности синапсов в этих клетках. Следовательно, нарушение метаболизма глюкозы может быть непосредственным триггером синаптической дисфункции.

Как показали результаты исследования на мышах с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия App^{swe} / PS1 Δ E9), резкое увеличение уровня глюкозы в головном мозге в течение 4 часов коррелировало с повышением уровня бета-амилоида во внеклеточном пространстве в ткани головного мозга на 25–39% во время гипергликемической нагрузки [502]. В тех же условиях уровень лактата во внеклеточном пространстве в ткани головного мозга также увеличивался. Поскольку лактат, выделяемый астроцитами, доставляется к нейронам, увеличение лактата во внеклеточном пространстве предполагает, что более высокие уровни глюкозы в головном мозге увеличивают активность нейронов [827]. Однако недавние исследования показали, что сами нейроны также поглощают глюкозу [201, 495].

Также интересен и тот факт, что у мышей с нейрон-специфическим нокаутом IR развивалось ожирение, инсулинорезистентность и повышались уровни инсулина и лептина в плазме [113]. С другой стороны, когда IR удалялся в астроцитах с использованием мышей линий hGFAP-creERT2 и GLAST-creERT2, нарушалась не только передача сигналов инсулина, но и поглощение глюкозы [269]. Эти результаты предполагают, что астроцитарный IR может участвовать не только в развитии инсулинорезистентности, но, что более важно, играть значимую роль в усвоении глюкозы.

Таким образом, инсулин-сигнальный путь может способствовать транспортировке глюкозы за счет регулирования GLUT, при этом высокие уровни глюкозы в виду снижения ее метаболизма могут приводить к

осаждению бета-амилоида, что в свою очередь 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. При этом наблюдается четкая взаимосвязь между нарушением инсулин-сигнализации, отложением бета-амилоида и митохондриальной дисфункцией, тем самым образуя порочный круг (**рисунок 9**).

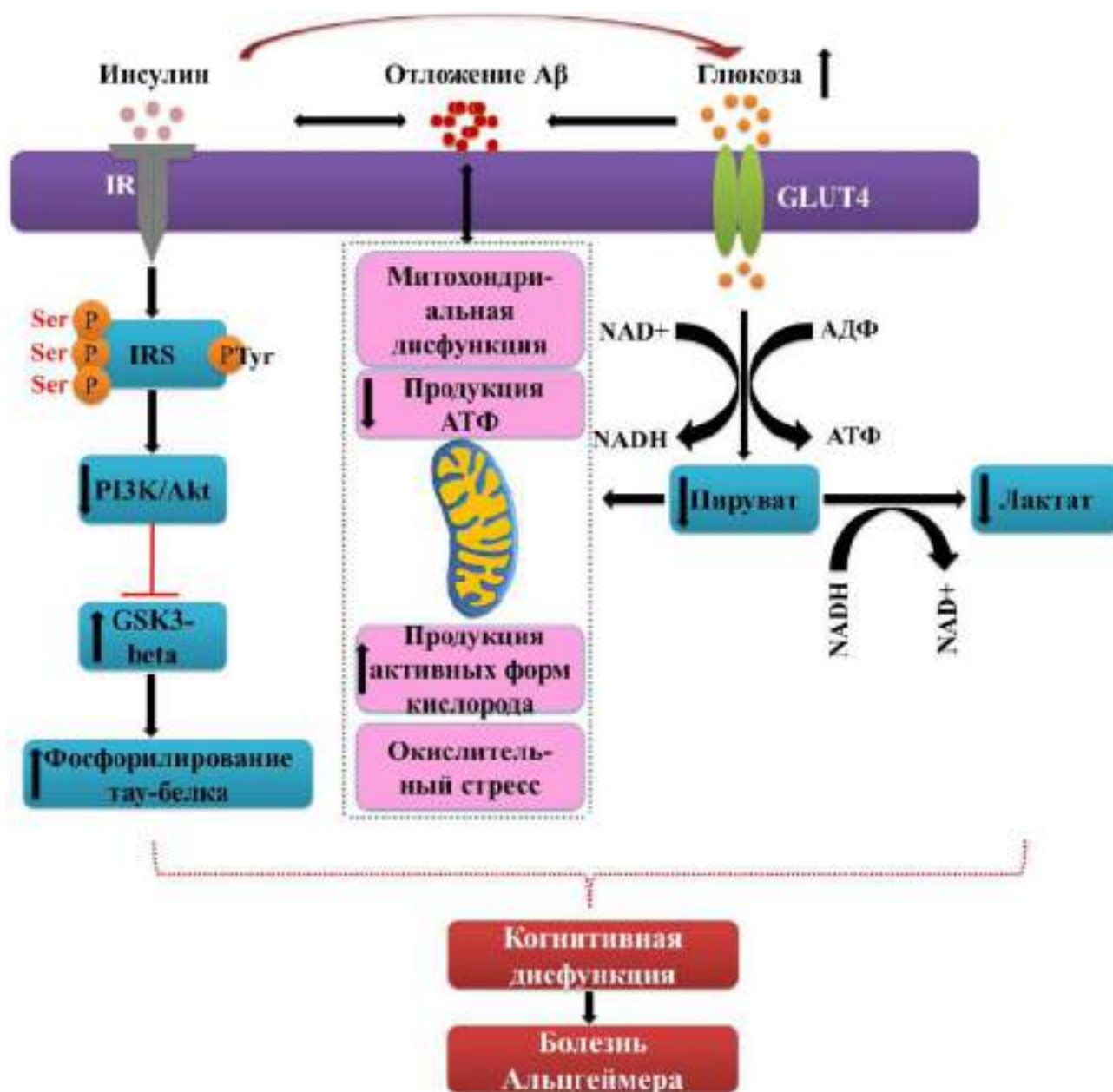


Рисунок 9 – Взаимосвязь нарушения передачи сигналов инсулина и метаболизма глюкозы при болезни Альцгеймера (на основании литературных данных)

Однако в последнее десятилетие появляется все больше данных, описывающих состояние реактивного или компенсаторного гиперметаболизма глюкозы при болезни Альцгеймера [61, 306]. Ashraf A. и соавторы сообщили о гиперметаболизме глюкозы в коре головного мозга лиц с амнестическими легкими когнитивными нарушениями. Гиперметаболизм глюкозы был

обнаружен у участников эксперимента как с отрицательным, так и положительным тестом на бета-амилоид. Противоположные результаты наблюдались у участников с наибольшей амилоидной нагрузкой, у которых было выявлено снижение метаболизма глюкозы. Интересно, что у участников с отрицательным тестом на бета-амилоид и гиперметаболизмом глюкозы не развивалась болезнь Альцгеймера в течение 18-месячного периода наблюдения, в то время как у участников с положительным тестом наблюдалось развитие нейродегенерации за аналогичный период времени [61]. Это дает возможность предположить, что церебральный гиперметаболизм глюкозы может предшествовать снижению метаболизма глюкозы на самых ранних стадиях развития болезни Альцгеймера.

В других экспериментах [496, 612, 653] на мышинных моделях с болезнью Альцгеймера (линии APP / PS1, 5xFAD и Tg2576) также выявлен гиперметаболизм глюкозы в кортикальном слое и гиппокампе в возрасте 12 месяцев. Более того, повышенное поглощение глюкозы как правило ограничивалось областями головного мозга, близкими к скоплению амилоидных бляшек.

В совокупности, представленные данные свидетельствуют о важной роли инсулина в регуляции церебрального метаболизма глюкозы, что, вероятно, оказывает значимое влияние и на когнитивные процессы, включая обучение и память.

1.11 Значение инсулина в реализации когнитивных функций в норме и при болезни Альцгеймера

Значительное повышение уровня периферического инсулина, как правило, в ответ на увеличение количества экзогенной или эндогенной глюкозы, способствует транспорту инсулина через ГЭБ в ЦНС, тем самым

обеспечивая реализацию важных функций головного мозга [465, 825]. Локализация рецепторов инсулина в гиппокампе предполагает возможное влияние инсулина на память, как одну из основных задач, реализуемых гиппокампом и тесно связанными структурами [614]. Так показано, что интрацеребровентрикулярное введение инсулина у крыс улучшает пространственную память, а также выработку условного рефлекса пассивного избегания в ответ на раздражитель [307, 597]. Клинические исследования, в ходе проведения которых использовали внутривенное введение инсулина с поддержанием эугликемии, показали улучшение показателей вербальной памяти [166, 412]. Подобное улучшение памяти наблюдалось и после интраназального введения инсулина [157, 169, 639].

В другом исследовании *in vivo* показано, что инсулин, активируя PI3K, протеинкиназу В и индуцируя долгосрочное потенцирование в синапсах, регулирует синаптическую пластичность в СА1 области гиппокампа, что необходимо для обучения и памяти, и таким образом, выступает в роли нейромедиатора [323]. Одним из предполагаемых механизмов модулирования инсулином синаптической пластичности является способность инсулина регулировать экспрессию рецептора N-метил-D-аспартата на мембране [711], что опосредовано активацией инсулином как молекул-компонентов ERK1 / 2 MAPK-пути, так и инсулин-сигнализацией по PI3K-Akt-пути [674, 678]. Это коррелирует с полученными Grillo С.А. и соавторами данными о нарушении долгосрочного потенцирования в синапсах и пространственного обучения у мышей с пониженной экспрессией инсулиновых рецепторов в гиппокампе [294]. В другом интересном исследовании показано, что церебральная резистентность к инсулину, вызванная диетой с высоким содержанием жиров, нарушает обучение и память и лежащую в их основе синаптическую пластичность в гиппокампе через гиперпальмитирование субъединицы GluA1 рецептора глутамата АМРА (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота), тем самым ингибируя передачу возбуждающих сигналов в синапсах [723].

Важно отметить и тот факт, что инсулин-сигнализация способствует синаптогенезу и синаптическому ремоделированию как в головном мозге крысы [140], так *in vitro* в культивируемых нейронах гиппокампа [346].

Интересно, что процесс обучения может модифицировать экспрессию и функцию инсулиновых рецепторов в определенных областях мозга [210, 720, 863]. Так, в исследовании *in vivo* показано, что тренировка пространственной памяти усиливает регуляцию мРНК инсулинового рецептора как в СА1 области, так и в зубчатой извилине гиппокампа, приводя к увеличению уровня IR в гиппокампе. Кроме того, последующий анализ *in vitro* выявил стимулированное инсулином фосфорилирование инсулинового рецептора по остатку тирозина [863], что, в совокупности, дает возможность предполагать о влиянии обучения как на концентрацию IR, так и на передачу сигналов инсулина в гиппокампе, а также других областях мозга.

Учитывая вышеупомянутую роль инсулина в регуляция синаптической пластичности и памяти, логично предположить о наличии корреляции между повышенным фосфорилированием остатков серина IRS1 и нарушением когнитивных функций (эпизодической и рабочей памяти) у пациентов с болезнью Альцгеймера [842]. Более того, изменения в передаче сигналов инсулина у разных моделей грызунов привело к ухудшению памяти и другим возрастным когнитивным изменениям. Так, у мышей с СД2 типа, индуцированного диетой с высоким содержанием жиров, наблюдали когнитивные нарушения на фоне пониженного фосфорилирования остатка тирозина инсулинового рецептора и повышенного фосфорилирования IRS1 по остаткам серина 312 и серина 341 в гиппокампе, что в свою очередь сопровождалось активацией маркеров воспаления (NFκB, JNK), а также биохимическими изменениями, связанными с повышенным отложением бета-амилоида, образованием нейрофибрилярных клубков и снижением синаптической пластичности [441]. В дополнение к этому, у трансгенных мышей линии APP / PS1 активация фактора некроза опухоли -альфа опосредует бета-амилоид-индуцированное фосфорилирование IRS1 по остаткам серина 312

и серина 636, что в конечном итоге приводит к синаптической дисфункции и ухудшению памяти [492].

Ряд исследований на животных продемонстрировали, что интраназальное введение инсулина улучшает пространственную память и распознавание объектов, а также принятие решений у мышей дикого типа (WT), с ускоренным старением (линия SAMP8) и мышинной модели болезни Альцгеймера (линии 3xTg-AD) [57, 134, 516, 668].

Также установлено, что назальный инсулин, вводимый человеку, снижает кровоток в гипоталамусе и префронтальной коре - явление, которое притупляется у людей с избыточным весом [447]. Поскольку префронтальная кора головного мозга играет решающую роль в принятии решений, включая пищевое поведение, эта область может быть внегипоталамической мишенью, с помощью которой инсулин регулирует потребление пищи. Более того, инсулин ЦНС снижает вкусовые качества пищи за счет подавления мезолимбических путей как у человека [770], так и у животных [451].

В другом эксперименте введение инсулина в вентральную область покрышки среднего мозга, имеющую решающее значение для изучения факторов окружающей среды, используемых для прогнозирования мотивационно значимых результатов [154], подавляет возбуждающую синаптическую передачу на дофаминовые нейроны, тем самым отменяя ранее установленное пищевое поведение и прием пищи, что наблюдается через несколько дней после 24-часового доступа к сладкой жирной пище [482].

Важно отметить, что нарушение принятия решений, обусловленное поражением префронтальной коры [277], было выявлено при различных неврологических расстройствах, таких как легкие когнитивные нарушения [854], болезнь Альцгеймера [84], сахарный диабет 1 типа [662], болезнь Паркинсона [828] и рассеянный склероз [68].

Повышенная нейрональная активация в таких областях головного мозга, как задняя и передняя поясная кора, миндалевидное тело, гиппокамп, префронтальная кора может носить компенсаторный характер и направлена на

повышение нейропластичности, которая заметно нарушается не только по мере прогрессирования болезни Альцгеймера [846], но и при легких когнитивных нарушениях [309]. В целом, на начальной стадии заболевания повышенная активность нейронов может компенсировать неэффективность пораженных областей головного мозга для принятия решений в неоднозначных условиях. Однако эти компенсаторные механизмы все еще до конца не ясны.

Примечательно, что четкой взаимосвязи между когнитивной дисфункцией и нарушением в принятии решений пока не установлено. Так, было обнаружено, что снижение общей когнитивной функции может привести к увеличению трудностей в принятии решений у пациентов с болезнью Альцгеймера [709]. Однако ряд других исследований не смогли выявить данную связь [68, 568, 707].

При этом важно учитывать, что согласно многочисленным экспериментальным данным церебральная инсулинорезистентность имеет выраженную взаимосвязь с развитием и прогрессированием когнитивных нарушений [38, 656, 775, 836]. Действительно, инсулин и его сигнальные пути не только регулируют баланс энергии и церебральный метаболизм, но также находятся в тесной связке с реализацией когнитивных функций [491]. Рецепторы инсулина распределены по всему головному мозгу, особенно в областях, связанных с познанием, таких как префронтальная кора и гиппокамп [614]. Недавние открытия также показали, что резистентность к инсулину отрицательно коррелирует с нейронной активностью в лобных областях при болезни Альцгеймера [744] и СД 2 типа [178]. Эти результаты могут дать представление о региональной уязвимости, связанной с развитием нейродегенерации альцгеймеровского типа, однако точные молекулярные механизмы еще предстоит изучить.

В целом, вышеупомянутые исследования формируют основу для понимания роли инсулина в функционировании памяти, одной из ключевых когнитивных способностей, нарушенных в результате развития болезни Альцгеймера.

1.12 Молекулы-маркеры и молекулы-мишени церебральной инсулинорезистентности

Инсулинорезистентность в головном мозге является отличительной чертой нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, способствуют развитию основных патологических признаков, таких как образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Полученные в ходе многочисленных исследований результаты позволили улучшить понимание роли инсулинорезистентности в этиологии и патогенезе болезни Альцгеймера, однако некоторые аспекты ее оценки все еще остаются неясными как для исследователей, так и клиницистов [401, 583].

Результаты проведенных за последние 2 десятилетия исследований убедительно доказывают значимую роль ряда молекул, таких как IR, IRS, Akt, PI3K, GSK-3beta, MAPK, GLUT4 и др., в инсулин-сигнальной трандукции и реализации эффектов инсулина, что дает возможность рассматривать их в качестве потенциальных молекул-маркеров инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера.

Так, одно из исследований было сфокусировано на IRS1, фосфорилированного по остатку серина, обозначаемого как IRS1-pS, в качестве ведущей молекулы-маркера ингибирования инсулин-сигнального пути. Интерес был обусловлен его высокой соэкспрессией с гиперфосфорилированным тау-белком в нейронах и нейритах, выявленной у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера [842]. Это не только свидетельствует, что фосфорилирование IRS1 по остатку серина является патологическим признаком болезни Альцгеймера, но и подтверждает связь между инсулинорезистентностью и патологией тау-белка.

В другом исследовании [864] с использованием культуры зрелых нейронов гиппокампа показано, что олигомеры бета-амилоида вызывали быстрое и существенное снижение уровня IR на поверхности нейронов, что

отражалось в нарушении синаптической пластичности, необходимой для реализации процесса обучения и памяти [360].

Немаловажным является и то, что высокий уровень активных форм кислорода, выявленный при болезни Альцгеймера, обусловлен активацией окислительного стресса [527]. При этом передача сигналов инсулина в мозг и окислительный стресс могут быть тесно связаны, поскольку индуцируемый бета-амилоидным пептидом нейрональный окислительный стресс блокируется инсулином. Механизм ингибирования инсулином окислительного стресса, возможно, включает активацию Akt [608], который, в свою очередь, ингибирует проапоптотический фактор транскрипции, а также FOXO3, опосредующий различные клеточные процессы, включая апоптоз, пролиферацию, прогрессирование клеточного цикла, повреждение ДНК и онкогенез [65, 489]. Это дает основание рассматривать Akt как одну из критически важных молекулярных компонентов инсулин-сигнального пути.

Еще одной значимой молекулой в инсулин-сигнальном пути является GSK3-beta, которая регулирует выживаемость клеток, а также их структурно-функциональную целостность. Нарушение инсулин-сигнализации вызывает фосфорилирование GSK-3beta по остатку серина [750], что приводит к фосфорилированию тау-белка, уменьшая его способность связывать и стабилизировать микротрубочки и, следовательно, нарушая нейрональный цитоскелет, препятствуя аксонному транспорту и облегчая формирование нейрофибрилярного клубка [312]. Кроме того, наличие рецепторов инсулина [25] и GSK-3beta [380] в синапсе предполагают их роль в структурном ремоделировании синапсов [464, 468]. Это убедительно подтверждают результаты одного из исследований, в котором снижение активности рецепторов инсулина на фоне активации GSK-3beta у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера приводит к синаптическому повреждению, что способствует развитию когнитивной дисфункции [388]. В целом, это указывает на роль GSK-3beta в развитии синаптической дисфункции как последствия нарушения инсулин-сигнализации, при этом ингибирование GSK-3beta на

ранней стадии развития болезни Альцгеймера может предотвратить нарушение целостности синапса и тем самым снизить негативные изменения в процессах обучения и запоминания [579, 651].

Также стоит отметить, что формирование памяти в гиппокампе опосредуется как передачей сигналов инсулином, так и церебральным метаболизмом глюкозы. При этом инсулинзависимый глюкозный транспортер GLUT4, локализованный преимущественно в нейронах [56], имеет решающее значение для поглощения глюкозы клетками головного мозга и реализации когнитивных эффектов инсулина [531]. Поэтому наблюдаемое при болезни Альцгеймера бета-амилоид-индуцированное нарушение передачи сигналов инсулина способствует снижению транслокации GLUT4, что сопровождается развитием aberrантного метаболизма глюкозы в гиппокампе и выраженными когнитивными нарушениями [602]. Таким образом, GLUT4 выступает в качестве одной из ключевых молекул в инсулин-сигнальном пути, необходимой для реализации процесса памяти в гиппокампе.

Примечательно, что в транспортных везикулах, помимо GLUT4, содержатся и дополнительные молекулы, в частности, инсулин-регулируемая аминопептидаза (IRAP) [239] и рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2R) [33], которые выступают в качестве регуляторов памяти. Известно, IRAP колокализуется с GLUT4 в гиппокампе [239] и является рецептором ангиотензина IV (AngIV), который потенцирует поглощение глюкозы в нейронах гиппокампа, тем самым улучшая пространственную рабочую память [40, 186]. Присутствие IRAP в транспортных везикулах может как способствовать стабильности GLUT4, так и регулировать рециркуляцию GLUT4 из эндосом в везикулы после транслокации и последующего эндоцитоза [389], что делает IRAP привлекательной мишенью для доклинических и клинических испытаний с целью поиска эффективной терапии нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Таким образом, совокупность эпидемиологических, доклинических и клинических данных убедительно 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 болезни Альцгеймера, и, наоборот, прогрессирование болезни Альцгеймера может служить пусковым механизмом развития инсулинорезистентности головного мозга, тем самым формируя порочный круг положительной обратной связи. Однако последовательность патологических изменений, которые вызывают развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа в сочетании с церебральной резистентностью к инсулину требует детального и глубокого изучения.

Ведь как известно, инсулин регулирует ряд ключевых функций головного мозга – регуляцию мозгового кровотока, воспалительные реакции, окислительный стресс, клиренс бета-амилоида, фосфорилирование тау-белка, апоптоз, метаболизм липидов, синаптическую пластичность и формирование памяти [172], которые существенным образом нарушаются при развитии болезни Альцгеймера. Поэтому можно высказать предположение о том, что локальная инсулинорезистентность может вызвать или способствовать проявлению полного спектра симптомов нейродегенерации. При этом насколько скорость развития инсулинорезистентности в головном мозге может определять и оказывать свое пагубное влияние на скорость прогрессирования болезни Альцгеймера?

Также стоит обратить внимание на значительное количество возможных причин, объясняющих снижение передачи сигналов инсулина в мозге при болезни Альцгеймера, от снижения уровня инсулина в спинномозговой жидкости [167] до потери сродства IR к инсулину в связи с изменением структуры рецептора [548]. Поэтому возникает закономерный вопрос, что же является основным фактором снижения передачи сигналов инсулина в головном мозге, наблюдаемое при развитии болезни Альцгеймера?

Интересен и тот факт, что интраназальное введение инсулина улучшает познавательные способности как при легких когнитивных нарушениях, так и на

ранней стадии развития болезни Альцгеймера [171]. Возможно ли усилить передачу сигналов инсулина в головном мозге, восстановить нейрональную активность и синаптическую пластичность, а также скорректировать церебральную инсулинорезистентность путем интраназального введения инсулина?

Кроме того, согласно результатам нескольких исследований [144, 813] непосредственной причиной инсулинорезистентности головного мозга при болезни Альцгеймера, по-видимому, является вызванное бета-амилоидом высвобождение микроглией провоспалительных цитокинов, что в свою очередь подавляет передачу сигналов инсулина, тем самым способствуя фосфорилированию IRS1 по остаткам серина в нейронах. Каким образом инсулин реализует свое действие как на клетках нейрональной, так и астроглиальной природы на фоне развития спорадической формы болезни Альцгеймера?

Важно отметить, что патологические изменения в микрососудах головного мозга и нарушение проницаемости ГЭБ, выявленные в мозге при болезни Альцгеймера, могут способствовать развитию когнитивной дисфункции и прогрессированию заболевания [522, 596]. Это находит свое отражение в снижении мозгового кровотока, нарушении доставки кислорода и питательных веществ, тем самым усугубляя неблагоприятные эффекты локальной резистентности к инсулину – усиление окислительного стресса, aberrантное фосфорилирование тау-белка, отложение амилоидных бляшек и дисфункция митохондрии [424]. При этом синтезируется ли инсулин в головном мозге или транспортируется через ГЭБ? Изменяется ли продукция эндогенного инсулина в ткани головного мозга?

Недавние данные свидетельствуют о том, что инсулин может влиять на отложение амилоидных бляшек и зависимое от нейродегенерации нарушение как синаптической пластичности, так и формирования памяти [170]. Какое влияние оказывают эффекты инсулина на процесс обучения, формирование различных видов памяти (пространственной, эмоциональной, социальной), а

также реализацию сложных форм поведения как на ранней, так и поздней стадии развития спорадической формы болезни Альцгеймера?

Особенно важно отметить и то, что ввиду тесной взаимосвязи между метаболическими заболеваниями, церебральной инсулинорезистентностью, снижением когнитивных функций и хронической нейродегенерацией альцгеймеровского типа возникает необходимость в идентификации молекулярных маркеров, способных обнаруживать развитие локальной резистентности к инсулину до развития эффектов или даже, возможно, в отсутствие периферической инсулинорезистентности, что в свою очередь может выступать в качестве детектора повреждения головного мозга из-за метаболических и нейродегенеративных нарушений. Это даст уникальную возможность объяснить причинно-следственную связь между этими заболеваниями и то, как адресное действие на компоненты инсулин-сигнального пути поможет в разработке новой стратегии профилактики и терапии болезни Альцгеймера в будущем.

Таким образом, можно выделить ряд основных нерешенных вопросов, связанных с этиологией церебральной инсулинорезистентности и ее вкладом в патогенез болезни Альцгеймера:

1. Что является первопричиной снижения передачи сигналов инсулина в головном мозге при развитии болезни Альцгеймера? Синтезируется ли инсулин нервными клетками, и если да, то каким образом нарушается данный процесс при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа? Изменяется ли продукция эндогенного инсулина в различных областях головного мозга при развитии болезни Альцгеймера? Какие механизмы лежат в основе нарушения передачи сигналов инсулина в клетках нейрональной и астроглиальной природы в различных отделах головного мозга (гиппокамп, миндалевидное тело) при развитии болезни Альцгеймера?

2. Насколько значимо присутствие продуктов протеолиза APP в клетках эндотелия при развитии болезни Альцгеймера? Какое влияние оказывает локальная инсулинорезистентность на эффекты бета-амилоида в

эндотелиальных клетках церебральных микрососудов и проницаемость ГЭБ при болезни Альцгеймера? Какие молекулярные механизмы лежат в основе регуляции структурно-функциональной целостности ГЭБ под действием бета-амилоида при болезни Альцгеймера? Какое влияние оказывает модуляция проницаемости ГЭБ и процесса ангиогенеза в норме и при болезни Альцгеймера?

3. Может ли активация ангиогенеза и формирование церебральных микрососудов с повышенной проницаемостью при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа выступать в качестве ведущего фактора, способствующего прогрессированию амилоидной ангиопатии?

4. Какое влияние оказывает бета-амилоид на синаптическую передачу в пораженных областях головного мозга (гиппокамп и миндалевидное тело) при болезни Альцгеймера?

5. Какие эффекты оказывает инсулин на миндалевидное тело как область головного мозга, которая отвечает за реализацию эмоциональной памяти, а также обработку эмоционально окрашенных событий, в условиях развития болезни Альцгеймера?

6. Оказывает ли влияние развитие церебральной инсулинорезистентности на реализацию сложных форм поведения и процессы обучения и запоминания при нейродегенерации альцгеймеровского типа?

Поэтому фундаментальная научная цель настоящего исследования направлена на расшифровку молекулярных механизмов нарушения продукции, транспорта и эффектов инсулина в клетках нейрональной и эндотелиальной природы, являющихся отражением роли церебральной инсулинорезистентности в развитии нейродегенерации при экспериментальной болезни Альцгеймера.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Описание животных

Мыши линии CD1, самцы в возрасте 4 месяцев. Группа CD1+A β 1-42 – инъекционная модель болезни Альцгеймера (введение бета-амилоида (A β 1-42, Sigma-Aldrich, США) в CA1 (*Cornu Ammonis*) зону гиппокампа билатерально по 1 мкл по стереотаксическим координатам [255]. Группа CD1+PBS – ложно-оперированные животные (введение фосфатно-солевого буфера (PBS, Sigma-Aldrich, США) в CA1 зону гиппокампа билатерально по 1 мкл по стереотаксическим координатам. В каждой группе было по 5-7 животных.

Мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте 4 месяцев. Группа C57BL/6+A β 1-42 – инъекционная модель болезни Альцгеймера (введение бета-амилоида (A β 1-42) по 1 мкл в CA1 зону гиппокампа [255]. Группа C57BL/6+PBS – ложно-оперированные животные (введение фосфатно-солевого буфера (PBS)). В каждой группе было по 5-7 животных.

Мыши линии B6SLJ-Tg(APP^{S_wFILon},PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799^{Vas}, самцы в возрасте 4 месяцев – генетическая модель болезни Альцгеймера (Tg6799). Контрольная группа – мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте 4 месяцев. В каждой группе было по 5-7 животных. Данные линии мышей получены из The Jackson Laboratory.

Выбор двух экспериментальных подходов к моделированию болезни Альцгеймера (инъекционная модель – с интрагиппокампальным введением бета-амилоида и трансгенная модель болезни Альцгеймера) был обусловлен необходимостью оценить влияние инсулинорезистентности на патогенез болезни Альцгеймера не только на стадии сформировавшейся нейродегенерации (что возможно с применением генетической модели), но и

при реализации острого нейротоксического эффекта бета-амилоида (инъекционная модель).

Использование в экспериментальном исследовании инбредной (C57BL/6) и аутбредной (CD1) линий объясняется тем, что как инбредные, так аутбредные линии имеют сопоставимый коэффициент вариации (отличия статистически незначимы) [785], что предполагает отсутствие выраженных фенотипических изменений в ответ на токсическое действие бета-амилоида в обеих линиях, что в свою очередь повышает статистическую мощность, воспроизводимость экспериментов и, следовательно, дает возможность использовать меньшее количество животных для проверки конкретной гипотезы. Кроме того, аутбредная линия мышей менее чувствительна к изменениям факторов окружающей среды и экспериментальных условий, что улучшает экспериментальную воспроизводимость [785].

Моделирование болезни Альцгеймера путем интрагиппокампального введения бета-амилоида с использованием мышей линии C57BL/6 обусловлено необходимостью проведения сравнительного анализа исследуемых показателей с животными линии B6SLJ-Tg(APP_SwF_{IL}on,PSEN1*M146L*L286V)6799Vas (5xFAD), генетическим фоном которых является C57BL / 6.

Использование в экспериментальных исследованиях трансгенных мышей, которые естественным образом имитируют хронический характер развития болезни Альцгеймера [230], позволяет выявить возраст-зависимое нарушение процессов обучения и запоминания, тревожно-депрессивное поведение, снижение общительности и социального взаимодействия – тех особенностей в поведении, которые свойственны пациентам с болезнью Альцгеймера. Данная модель позволяет оценить влияние хронической аккумуляции бета-амилоида на развитие нарушений передачи сигналов инсулина в ткани головного мозга, ангиогенез и проницаемость ГЭБ, т.е. изучить патогенез в различных аспектах и установить причинно-следственную связь.

Однако, учитывая высокую стоимость указанной модели и значительное количество времени, которое требуется для формирования амилоидных бляшек

и проявления бета-амилоид-индуцированных синаптических и поведенческих нарушений, дает основание для включения в качестве объекта исследования инъекционную модель. Данная модель воспроизводит амилоидопатию *in vivo* за короткий промежуток времени (в течение 10 дней после оперативного вмешательства) и демонстрирует развитие бета-амилоидной патологии, что является особенностью семейной и спорадической формы болезни Альцгеймера. Более того, инъекционную модель отличает возможность регулирования и контроля концентрации вводимого бета-амилоида, управляемость, что подразумевает развитие нейродегенерации у большинства экспериментальных животных в группе практически одновременно [418]. В совокупности, инъекционная модель дает возможность изучить влияние острого токсического действия бета-амилоида на изменения инсулин-сигнальной трансдукции, эффекты инсулина на синаптическую передачу, а также служит источником клеток для проведения исследований *in vitro* по оценке RAGE-опосредованных сигнальных механизмов нарушения ангиогенеза и проницаемости ГЭБ.

Животных содержали в стандартных условиях в индивидуально вентилируемых клетках площадью 435 см², предназначенных для 5 мышей. Клетки подключены к приточно-вытяжной установке модели Smart Flow, которая обеспечивает высокий уровень защиты от бактерий, вирусов и аллергенов. Ванночка клетки выполнена из поликарбоната, решетка – из нержавеющей стали с углублением для корма, крышка из поликарбоната с защелками и микробиологическим фильтром, обеспечивающим оптимальную циркуляцию газов на уровне клетки. Каждая клетка снабжена бутылочкой из поликарбоната объемом 200 мл для питьевой воды. После проведения операции каждую мышь содержится в индивидуально вентилируемой клетке площадью 435 см², которая снабжена бутылочкой из поликарбоната объемом 200 мл для питьевой воды. Животных содержали в клетках при температуре 21±1°C и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь со свободным доступом к воде и корму.

Общее количество животных, использованных при выполнении работы, составило $n=200$.

Соответствие нормам законодательства.

Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Эксперименты проводили после рассмотрения заявки и протокола на использования лабораторных животных на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» (Выписка из протокола № 2 от «29» октября 2013 г.), на котором постановили «утвердить заявку и протокол на использование лабораторных животных для исследования».

Планирование и проведение экспериментов на животных осуществлялось при соблюдении «**принципа 3R**»: **Replacement** – использование альтернативных методов (например, культуры клеток); **Reduction** – использование минимального количества животных в эксперименте; **Refinement** – не подвергать животных безосновательному стрессированию до, во время и после проведения эксперимента.

2.2 Дизайн исследования и группы экспериментальных животных

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

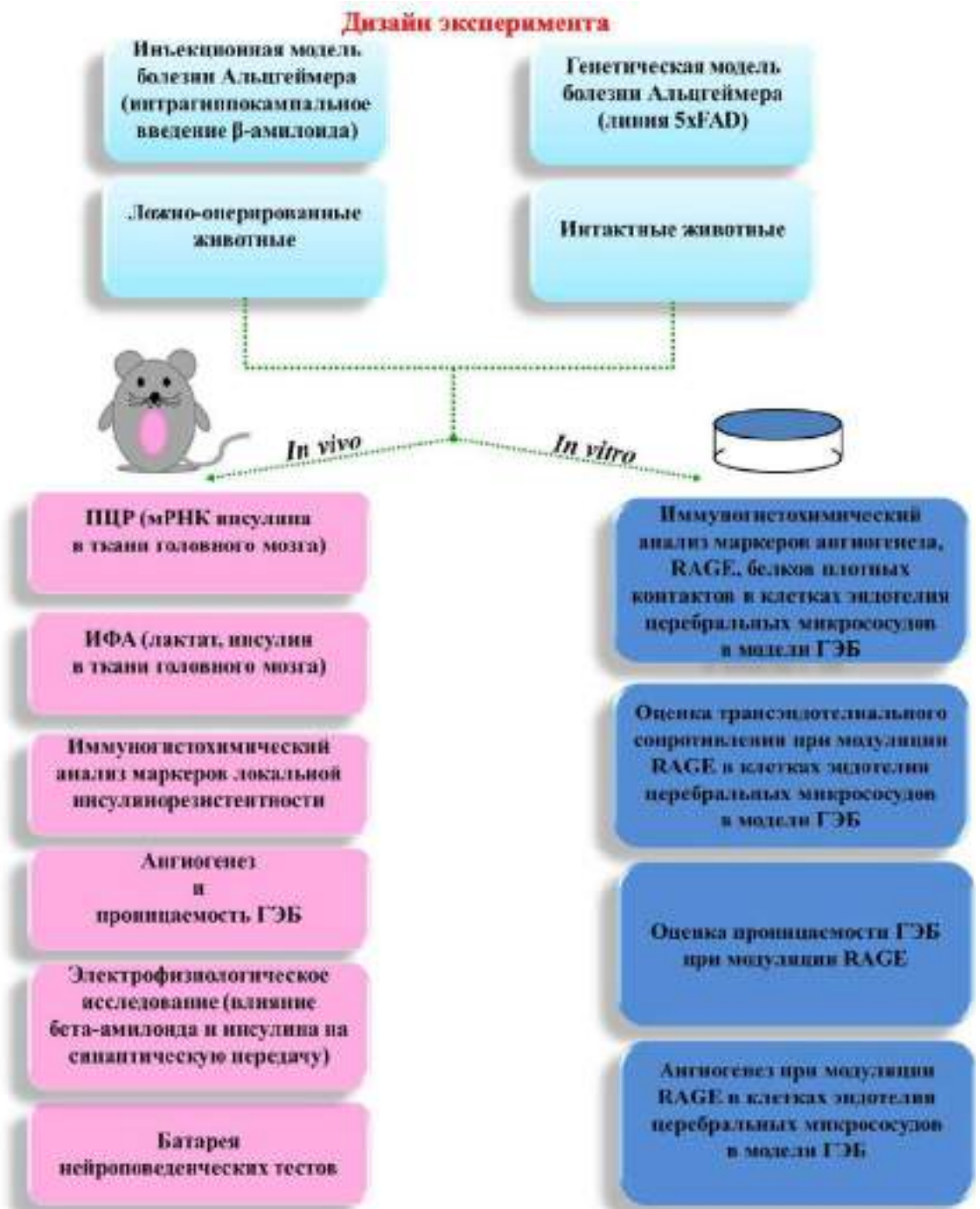


Рисунок 10 – Дизайн блока исследовательской работы

1-й блок – оценка экспрессии мРНК инсулина в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

2-й блок – оценка уровня лактата и инсулина в различных регионах головного мозга (гиппокамп, миндалевидное тело, ольфакторная луковица) в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

3-блок – иммуногистохимический анализ молекул-маркеров и молекул-мишеней инсулинорезистентности (IR, IRS1, IRAP, GLUT4, MAPK, PKC, GSK-3 beta, Fe65, Abeta, RAGE) в различных регионах головного мозга (гиппокамп, миндалевидное тело) в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

4-й блок – оценка изменения проницаемости ГЭБ *in vivo*, церебрального ангиогенеза и микроциркуляции в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

5-й блок – изучение особенностей нейропластичности и синаптической передачи в различных отделах головного мозга (гиппокамп и миндалевидное тело) в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

6-й блок – изучение особенностей реализации эмоций и когнитивных функций в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

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 модели болезни Альцгеймера.

8-блок – оценка трансэндотелиального сопротивления 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 модели болезни Альцгеймера.

9-й блок – изучение особенностей проницаемости эндотелиальных клеток ГЭБ для высокомолекулярных соединений (FITC-декстрана) *in vitro* при модуляции RAGE в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

10-блок – изучение экспрессии маркеров ангиогенеза (VEGFR2 и CD34) при RAGE-модуляции в эндотелиальных клетках церебральных сосудов в составе модели ГЭБ *in vitro*.

В каждом блоке исследований были сформированы группы животных.

1-й блок:

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 болезни Альцгеймера (n=7).

Схема-дизайн исследования представлен на **рисунке 11**.



Рисунок 11 – Схема-дизайн исследования экспрессии мРНК инсулина в ткани головного мозга в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера

2-й блок:

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 болезни Альцгеймера (n=10).

Схема-дизайн исследования представлен на **рисунке 12**.



Рисунок 12 – Схема-дизайн исследования уровня лактата и инсулина в ткани головного мозга в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера

3-блок:

группа №1 – мыши линии C57BL/6 с введением PBS – ложно-оперированные животные (n=7);

группа №2 – мыши линии C57BL/6 с введением Аβ1-42 – инъекционная модель болезни Альцгеймера (введение бета-амилоида (Аβ 1-42) (n=7);

группа №3 – мыши линии CD1 с введением PBS – ложно-оперированные животные (n=7);

группа №4 – мыши линии CD1 с введением Аβ1-42 – инъекционная модель болезни Альцгеймера (n=7);

группа №5 – мыши линии C57BL/6 – контрольная группа (n=5);

группа №6 – мыши линии B6SLJ-Tg(APP^{SwFILon},PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799^{Vas} (Tg6799) – генетическая модель болезни Альцгеймера (n=5).

Схема-дизайн исследования представлен на **рисунке 13**.



Рисунок 13 – Схема-дизайн исследования экспрессии молекул-маркеров и молекул-мишеней инсулинорезистентности в различных регионах головного мозга в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера

(А) у животных с интрагиппокампальным введением бета-амилоида и PBS; (Б) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера.

4-й блок:

группа №1 – мыши линии C57BL/6 – контрольная группа (n=5); группа №2 – мыши линии B6SLJ-Tg(APP^SwF1Lon,PSEN1*M146L*L286V)6799Vas (Tg6799) – генетическая модель болезни Альцгеймера (n=5).

Схема-дизайн исследования представлен на **рисунке 14**.

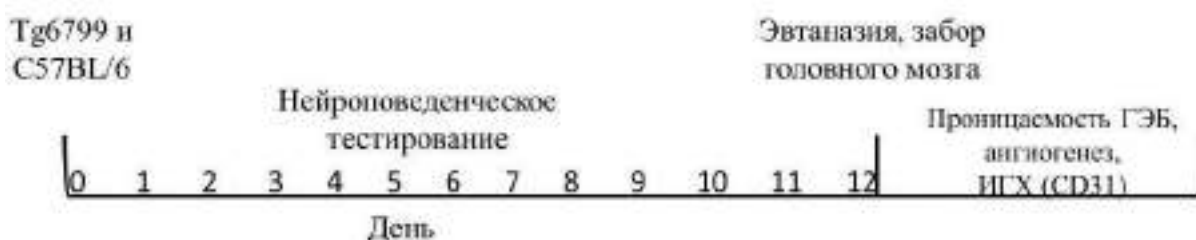


Рисунок 14 – Схема-дизайн исследования проницаемости ГЭБ in vivo, церебрального ангиогенеза и микроциркуляции в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера

5-й блок:

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 болезни Альцгеймера (введение бета-амилоида (A β 1-42) (n=10).

Схема-дизайн исследования представлен на **рисунке 15**.

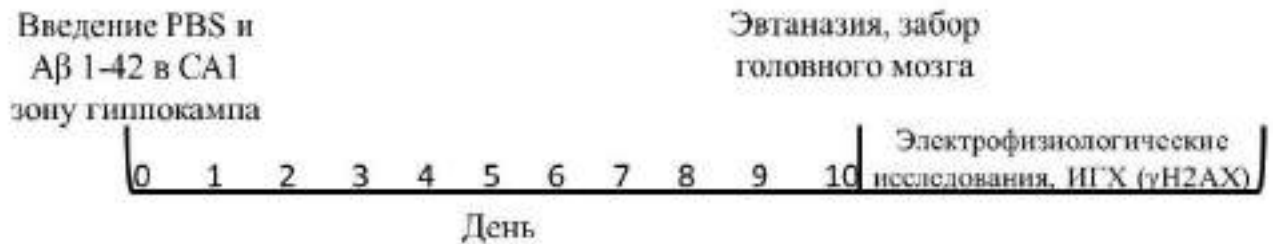


Рисунок 15 – Схема-дизайн исследования нейропластичности и синаптической передачи в различных отделах головного мозга (гиппокамп и миндалевидное тело) в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера

6-й блок:

группа №1 – мыши линии C57BL/6 – контрольная группа (n=5); группа №2 – мыши линии B6SLJ-Tg(APP^SwF^Lon,PSEN1*^M146L*^L286V)6799Vas (Tg6799) – генетическая модель болезни Альцгеймера (n=5).

Схема-дизайн исследования представлен на **рисунке 16**.



Рисунок 16 – Схема-дизайн исследования особенностей реализации эмоций и когнитивных функций в норме и при экспериментальной модели болезни Альцгеймера

7-й блок:

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 Аβ1-42 (моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера) (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 Аβ 1-42 (моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера) (n=5).

8-блок:

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 болезни Альцгеймера (C57BL/6+Аβ1-42) (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;
- Аβ1-42 – эндотелиоциты после добавления Аβ1-42.

9-й блок

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 болезни Альцгеймера (C57BL/6+Аβ1-42) (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.

10-блок:

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 болезни Альцгеймера (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.

2.3 Моделирование нейродегенерации альцгеймеровского типа

Бета-амилоид (A β 1-42, Sigma-Aldrich, США) растворяли в фосфатно-солевом буфере до концентрации 50 μ M с последующей агрегацией в термостате при 37°C в течение 7 дней. С каждой стороны гиппокампа в СА1 зону вводили по 1 мкл бета-амилоида [225].

Послеоперационный период для животных составлял 5 суток, затем их ссаживали вместе по группам. Признаки болезни Альцгеймера выявляли, начиная с 10 суток [710] после проведения операции, поскольку в послеоперационный период каждое животное содержалось в индивидуальной клетке, и проведение батареи нейроповеденческих тестов было неприемлемо.

Перед проведением операции животное взвешивали на весах с целью точного расчета дозировки анестетика. Для подавления ноцицепции использовали ксилазин в дозе 10 мг/кг веса животного. Анестезию проводили с использованием хлоралгидрата (Sigma-Aldrich, США), который вводили интраперитонеально в дозе 100 мг/кг веса животного, при этом продолжительность анестезии составляла от 40 мин до 1 ч. Перед фиксированием в стереотаксической рамке, у животного проверяли отсутствие болевой чувствительности, оценивали частоту сердечных сокращений и дыхания. Убедившись в наступлении анестезии, проводили стрижку шерсти с головы животного с использованием электрической бритвы. Затем наносили гель для глаз «Офтагель». После инфильтрационной анестезии лидокаином, делали разрез на голове с помощью скальпеля. Используя хирургические ножницы разрез растягивали вперед к задним частям глаз и назад между ушей. Перикраниальные ткани удаляли с помощью ватного тампона и обрабатывали перекисью водорода.

Уровень головы животного измеряли по z координатам брегмы и лямбды и подгоняли позицию головы таким образом, чтобы они стали равными. Уровень головы по горизонтали в передне-заднем направлении (выравнивание в медиально-латеральном направлении) достигали правильным расположением крепления для ушей животного. Подгоняли иголку микроинжектора для стереотаксической рамки и брали DV (dorsal – Ventral, глубина) значения у брегмы и лямбды. Выравнивали крепления резцов и зажим для носа, чтобы подвести координаты DV брегмы и лямбды в пределах 0,1 мм друг от друга. Нулевой масштаб DV у брегмы. Устанавливали прицел в стереотаксической рамке, выравнивали перекрест с брегмой и нулем AP (anterior-posterior) (передне-задней) и ML (medial-lateral (медиально-латеральной) шкалой. Измеряли положение x и y координат брегмы и определяли место целевой инъекции. Устанавливали сверло в стереотаксической рамке, ставили в целевые AP и ML координаты и просверливали отверстие в черепе. Координаты для CA1 зоны гиппокампа: ML локализация от брегмы $\pm 1,3$ мм, в AP направлении

от брегмы $\pm 2,0$ мм, DV $\pm 1,9$ мм [142]. Затем устанавливали иглу для стереотаксической рамки и проводили инъекционное введение амилоида в течение 5 мин со скоростью 0,2 мкл/мин. После введения амилоида место инъекции обрабатывали ватным тампоном, смоченным этиловым спиртом.

Затем проводили наложение швов на рану, обрабатывали мазью с антибиотиком Левомеколь, убирали животное из стереотаксической рамки и клали на специальное одеяло с подогревом. Далее вблизи с раной вводили инъекционно под кожу анестетик лидокаин для местной анестезии во время раннего периода восстановления после операции. Для предотвращения обезвоживания подкожно вводили физиологический раствор в дозе 10 мл/кг веса животного.

После пробуждения от анестезии, животному вводили анальгетик кетонал в дозе 0,05 мг/кг. Возвращали животное в чистую клетку. Спустя 8-10 ч после операции насыпали корм в клетку и ставили бутылочку с водой. На первый и второй день после операции инъекционно вводили мелоксикам в дозе 1 мг/кг. В течение 5 дней оценивали восстановление животного, на шестой день – помещали в общую клетку [310].

Для оценки неврологического статуса испытуемые животные – группа CD1+A β 1-42 и группа CD1+PBS подвергались тестированию «Fear conditioning» в период с 10 по 12 день после оперативного моделирования болезни Альцгеймера.

Испытуемых животных – мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (Tg6799) возрасте 4 и 12 месяцев и контрольную группу – мыши линии C57BL/6 в возрасте 4 и 12 месяцев тестировали, используя следующие поведенческие тесты: тест «Распознавание нового объекта», тест «Черно-белая камера», тест «Приподнятый крестообразный лабиринт», Трехкамерный тест, тест «Восьмирукавный радиальный лабиринт».

Утилизация биологического материала. Трупы животных герметично упаковывали и сразу помещали в морозильную камеру, предназначенную

только для хранения трупов животных. Затем централизованно вывозили для утилизации.

2.4 Нейропсихическое тестирование животных

После проведения операции каждое животное помещалось в отдельную клетку на 5 дней для предотвращения повреждения швов, при этом каждое животное подвергалось ежедневному осмотру.

Наблюдение за мышами группы CD1+A β 1-42, группы CD1+PBS и тестирование производилось в соответствии со следующим графиком:

День 0 – Операция;

День 1 – Обработка швов, анальгетик мелоксикам в дозе 1 мг на килограмм веса животного, оценка общего состояния;

День 2 – Обработка швов, анальгетик мелоксикам в дозе 1 мг на килограмм веса животного, оценка общего состояния;

День 3 - День 5 – Обработка швов, оценка общего состояния;

День 6 – Обработка швов, оценка общего состояния, перемещение животных в общую клетку;

День 7 - День 9 – Обработка швов, оценка общего состояния, наблюдение за взаимодействием в клетке;

День 10 – Тест «Fear conditioning»: 1 день «Conditioning» - Условия;

День 11 – Тест «Fear conditioning»: 2 день «Context test» - Контекстный тест;

День 12 – Тест «Fear conditioning»: 3 день «Cued test» - Сигнальный тест. Эвтаназия, транскардиальная перфузия головного мозга с последующим забором головного мозга в условиях культуральной лаборатории для последующего анализа.

Поведенческое тестирование проводилось с 9:00 до 15:00.

Наблюдение за мышами с генетической моделью болезни Альцгеймера (Tg6799) и мышами линии C57BL/6 начиналось с возраста 21 день и завершалось в возрасте 12 месяцев. Тестирование проводилось в 2 этапа: 1 этап – в возрасте 4 месяцев, когда наблюдаются умеренные когнитивные нарушения (снижение памяти) [198, 580], 2 этап – в возрасте 12 месяцев, когда наблюдаются ярко выраженные нарушения поведения, различных видов памяти и когнитивных функций [248, 588]. Тестирование проводилось согласно следующему графику:

День 1 – Первый день теста «Распознавание нового объекта»;

День 2 – Второй день теста «Распознавание нового объекта»;

День 3 – Третий день теста «Распознавание нового объекта»;

День 4 – Тест «Черно-белая камера»;

День 5 – Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»;

День 6 – Трехкамерный тест;

День 7 – Первый день теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт»;

День 8 – Второй день теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт»;

День 9 – Третий день теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт»;

День 10 – Четвертый день теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт»;

День 11 – Пятый день теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт»;

День 12 – Шестой день теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт».

Эвтаназия, транскардиальная перфузия головного мозга с последующим забором головного мозга в условиях культуральной лаборатории для последующего анализа.

Не менее чем за 60 мин до тестирования животных приносили в комнату тестирования для адаптации к среде, в которой будет проходить тестирование. В этот период исключалась перегруппировка животных, кормление, взятие в руки и другие активные манипуляции, чтобы не провоцировать состояние стресса перед тестированием.

Поведенческое тестирование проводилось с 9:00 до 15:00.

2.4.1 Тест «Распознавание нового объекта»

Установка представляет собой радиальную арену с непрозрачными бортами, $d=80$ см, высота 20 см.

Тестирование выполняли в 2 этапа с перерывом в 24 ч: на первом – в центр поля помещали 2 одинаковых объекта – цилиндр №1 (10x5 см) и цилиндр №2 (10x5 см) и проводили тестирование животного в течение 10 мин; на втором этапе - в центр поля помещали один объект с первого этапа – цилиндр №1 (10x5 см) и новый объект - куб №3 (5x5x5 см) проводили тестирование животного в течение 10 мин. Регистрацию проводили с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения ANY-maze (Stoeling Co., Wood Dale, IL, США).

В каждой сессии оценивали двигательную активность по пройденному расстоянию (в метрах), время в наружной зоне, время во внутренней зоне, количество входов во внутреннюю зону, время нахождения около объекта №1 и №2 (на первом этапе), время нахождения около объекта №1 и №3 (на втором этапе), количество входов в зону нахождения объекта №1, №2 и №3.

В тесте «Распознавание нового объекта» были определены два основных индекса: индекс различий (DI – difference index) и индекс распознавания (RI – recognition index). Индекс различия (DI) – индекс, который позволяет различать новые и знакомые объекты. Значение может варьировать между +1 и -1, где положительное число указывает на большее время, проведенное с новым объектом, отрицательное – на большее время, проведенное со знакомым объектом, а нулевое значение указывает на нулевое предпочтение [54]. Индекс распознавания (RI) – время, потраченное на исследование нового объекта относительно общего времени исследования объектов. Этот показатель является основным показателем способности запоминать [105].

2.4.2 Тест «Черно-белая камера»

Использование данного теста является одним из подходов в оценке индивидуальной реактивности животных (склонность к тревоге, страху, депрессии) [759]. Черно-белая камера (ЧБК) представляет собой закрытый ящик, состоящий из двух отсеков, разделенных перегородкой: светлого (30x26x20 см) и темного (30x26x20 см). Отсеки сообщаются между собой через отверстие в перегородке (3x3 см). Сверху темный отсек снабжен плотно подогнанной открывающейся наверх крышкой. Мышь помещали в светлую зону спиной к входу в темный отсек. Продолжительность тестирования составляла 10 мин. Регистрацию проводили с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения ANY-maze (Stoeling Co., Wood Dale, IL, США).

В ходе эксперимента регистрировали следующие показатели: латентное время первого входа в темный отсек, время нахождения в светлом и темном блоке, число входов в темный отсек.

2.4.3 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Данный тест был использован для оценки эмоционального состояния, тревожности, боязни высоты, исследовательской и двигательной активности грызунов [434]. Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) состоит из перпендикулярно расположенных друг относительно друга на высоте 1 м двух открытых (50x5 см) и двух закрытых рукавов (50x5 см). Животное помещали в центр лабиринта и проводили видеорегистрацию в течение 10 мин. Оценивали время пребывания в закрытых и открытых «рукавах», количество входов в

закрытые и открытые «рукава», длительность нахождения животного в центре. Регистрацию проводили с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения ANY-maze (Stoeling Co., Wood Dale, IL, США). Тревожное поведение грызунов оценивали по отношению времени, проведенного в открытых рукавах, ко времени, проведенному в закрытых рукавах, а антитревожное поведение – по увеличению времени пребывания/числу входов в открытых рукавах.

2.4.4 Трехкамерный социальный тест

Тест использовали для оценки социального взаимодействия и социальной памяти у животных [525].

Устройство представляет собой прямоугольный ящик из жесткого поливинилхлорида серого цвета, имеет две боковые (30x30 см) и одну центральную камеру (12x30 см) с квадратными переходами между отсеками (10x10 см).

Тестирование выполняли в 3 этапа с перерывом в 10 мин: на первом этапе (фаза привыкания) – в две боковые камеры устанавливали несоциальный объект (цилиндр, 10x5см), животное помещали в центральную камеру и проводили видеорегистрацию в течение 10мин; на втором этапе (фаза социализации) – в левую камеру помещали социальный объект 1 (мыши линии CD1, самка в возрасте 4 месяцев, находящаяся в цилиндре (10x5 см)) и проводили тестирование животного в течение 10 мин; на третьем этапе (фаза предпочтения) – в правую камеру помещали новый социальный объект 2 (мыши линии CD1, самка в возрасте 4 месяцев, находящаяся в цилиндре (10x5 см)), оставляя в левой камере ранее помещенный социальный объект 1, и проводили тестирование животного в течение 10 мин. Регистрацию проводили с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения ANY-

maze (Stoeling Co., Wood Dale, IL, США). В каждой сессии оценивали двигательную активность по пройденному расстоянию (в метрах), время нахождения в правой, левой и центральной камерах, количество входов в левую и правую камеры, время нахождения около социального объекта 1 и 2, количество входов в зону нахождения социального объекта 1 и 2.

2.4.5 Тест «Восьмирукавный радиальный лабиринт»

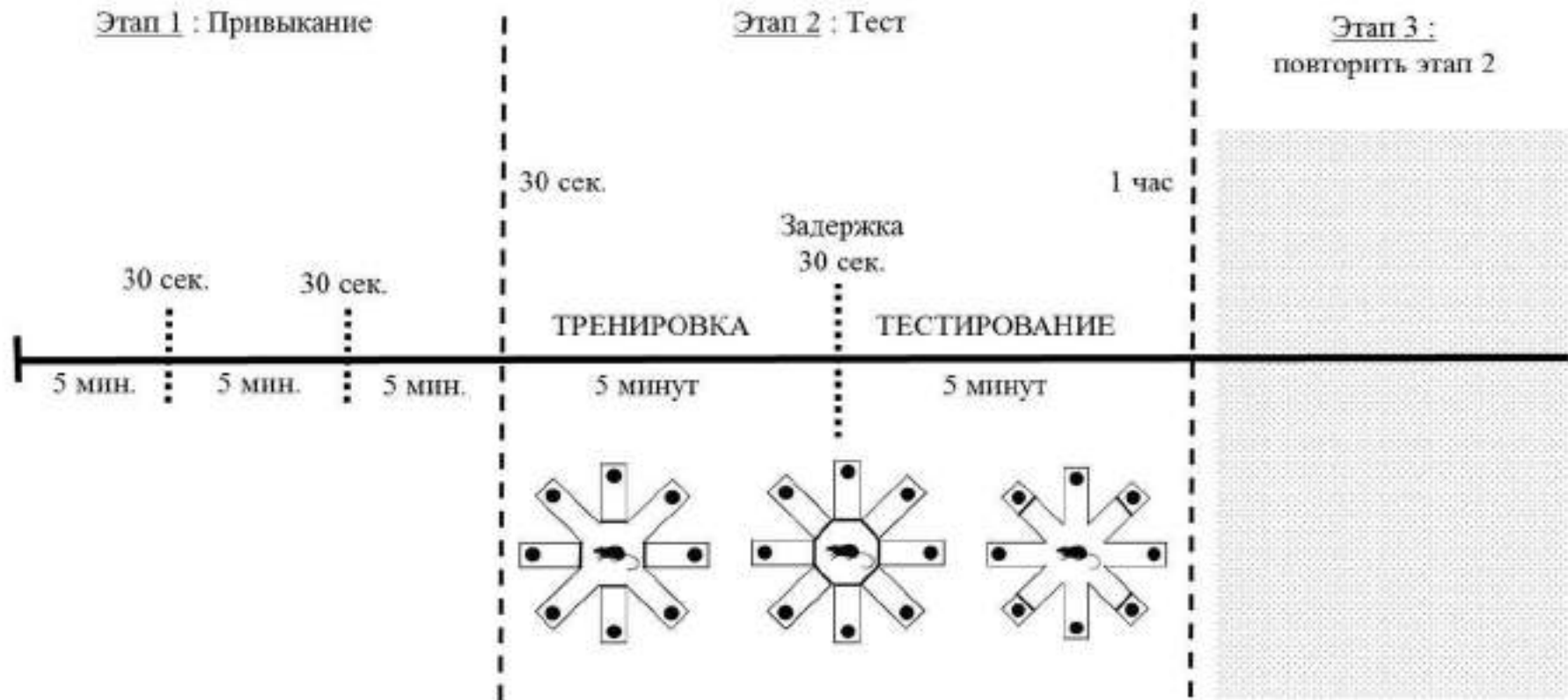
Тест использовали для оценки рабочей и долговременной пространственной памяти на моделях животных [30, 224, 606].

Продолжительность тестирования (количество дней) определяется экспериментальным путем, при этом протокол адаптируется таким образом, чтобы выбранное количество дней тестирования в конечном итоге приводило к достижению оптимального результата [606].

Важно подчеркнуть и тот факт, что включение в протокол теста этапа привыкания дает возможность снизить эмоциональную нагрузку у животного при попадании его в новую среду, и следовательно, более эффективно провести этап тренировки и непосредственно тестирования для получения качественного результата [647, 877].

Устройство для проведения тестирования представляет собой восьми-рукавный радиальный лабиринт (длина радиальных рукавов 35 см, ширина радиальных рукавов 6 см, диаметр центральной части 20 см, высота стенок 15 см, высота над полом 50 см), выполненный из серого поливинилхлорида. Каждый рукав лабиринта отделён от центральной площадки съёмной гильотинной дверкой. В конце каждого рукава располагается кормушка для пищевого подкрепления, отделенная гильотинной дверкой. Поведение регистрировали с помощью подвесной камеры, установленной над лабиринтом.

Протокол тестирования (**рисунок 17**) был разработан на основании ранее представленного протокола Richter S.H. и соавторы [647].



День	1	2	3	4	5	6
Исполняемый этап	1, 2, 3	2, 3	2, 3	2, 3	—	2, 3

Рисунок 17 – Протокол теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт»

Тестирование проводили 2 раза в день с перерывом в течение 60 мин (оценка оперативной памяти) в течение 6 дней подряд с перерывом на 5-й день тестирования (оценка долговременной памяти). Тестирование состояло из нескольких этапов:

1 этап – Привыкание. Для знакомства с устройством животное помещали в центре лабиринта. Через одну минуту одновременно открывали все восемь гильотинных дверей с предварительным помещением на конце каждого рукава пищевой награды (сахар), и позволяли животному исследовать весь аппарат в течение 5 мин. Затем закрывали все двери, оставляя животное в центре лабиринта на 30 сек. После вновь одновременно открывали все восемь гильотинных дверей для исследования устройства в течение 5 мин с последующим закрытием дверей и оставлением животного в центре лабиринта на 30 сек. Затем снова одновременно открывали все восемь гильотинных дверей для исследования устройства в течение 5 мин.

2 этап – Тест. Состоял из трех фаз: тренировки, задержки и тестирования. На фазе тренировки в течение 5 мин животное исследовало четыре случайно выбранных рукава с предварительным помещением на конце каждого рукава кусочка сахара, а остальные четыре рукава были заблокированы с помощью гильотинных дверей. Затем закрывали все двери, оставляя животное в центре лабиринта на 30 сек (фаза задержки). На фазе тестирования, которая длилась 5 мин, одновременно открывали все восемь дверей, предварительно размещая пищевую награду только в те рукава, которые ранее были заблокированы. Таким образом, животное должно было входить только в те рукава, которые были закрыты на фазе тренировки.

3 этап – Повторить этап 2 через 60 мин. Пространственную память оценивали по количеству входов в рукава, при этом однократный вход в рукава считался корректным, тогда как повторный вход в рукав – некорректным (ошибкой).

Общая оценка памяти была рассчитана по формуле (1) следующим образом [647]:

$$\text{Оценка памяти} = \frac{(\text{количество корректных входов}) - (\text{количество некорректных входов})}{(\text{количество корректных входов}) + (\text{количество некорректных входов})}, \quad (1)$$

где количество корректных входов – количество однократных входов в рукав;

количество некорректных входов - количество повторных входов в рукав.

2.4.6 Тест «Fear conditioning»

Данный тест использовали для оценки ассоциативного обучения и консолидации памяти страха [704].

Устройство для проведения тестирования представляет собой акриловую квадратную камеру (размер 33 см x 25 см x 28 см) с электрифицированным решетчатым полом, которая помещается в звуконепроницаемую камеру (размер 170 см x 210 см x 200 см), чтобы минимизировать внешние шумы во время тестирования. Подсветка (светоизлучающие диоды 100 люкс) и динамик, подключенный к белому шуму (условный раздражитель (УР)), крепится к потолку над испытательной камерой. Решетчатый пол подключен к электрогенератору для подачи электрического сигнала (безусловный раздражитель (БР)).

В первый день (Тест «Условия») мышь помещается в испытательную камеру для свободного исследования в течение 120 сек. После 120 сек подается белый шум (условный раздражитель) в течение 30 сек. Электрический сигнал 0,3мА (безусловный раздражитель) подается непрерывно в течение последних 2 сек белого шума. Через 90 сек вновь подается белый шум (условный раздражитель) в течение 30 сек и электрический сигнал 0,3мА (безусловный раздражитель) в течение последних 2 сек белого шума. Сочетание белого шума (условный раздражитель) и электрического сигнала 0,3мА (безусловный раздражитель) повторяется 3 раза в течение тестирования (120, 240 и 360 сек после начала тестирования) (**рисунок 18**). После этого мышь оставляют в покое в камере в течение 90 сек.

Во второй день (Контекстный тест) мышь помещается в испытательную камеру для свободного исследования в течение 300 сек без подачи белого шума (условный раздражитель) и электрического сигнала 0,3мА (безусловный раздражитель) (**рисунок 18**).

В третий день (Сигнальный тест) мышь помещают в другую испытательную камеру с черным полом, черно-белыми стенами и освещенностью 30 люкс. В течение первых 180 сек мышь свободно исследует камеру. По истечении указанного времени подается белый шум (условный раздражитель) в течении 180 сек, но без электрического сигнала 0,3мА (безусловный раздражитель) (**рисунок 18**).

Регистрацию проводили с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения ANY-maze (Stoeling Co., Wood Dale, IL, США).

Контекстный и сигнальный тест состояния страха дают возможность оценить способность запоминать неприятный (условный) стимул и связать его с определенной средой. В контекстном тесте состояния страха осуществляется форма обучения, которая, как правило, считается гиппокамп зависимой, тогда как в сигнальном тесте состояния страха, как полагают, реализуется гиппокамп независимая форма обучения [308, 658].

Наиболее распространенным элементом в поведении, вызванным сильной болью или страхом, является замирание, что часто используется для количественной характеристики ассоциативного обучения и консолидации памяти страха в тесте [247].

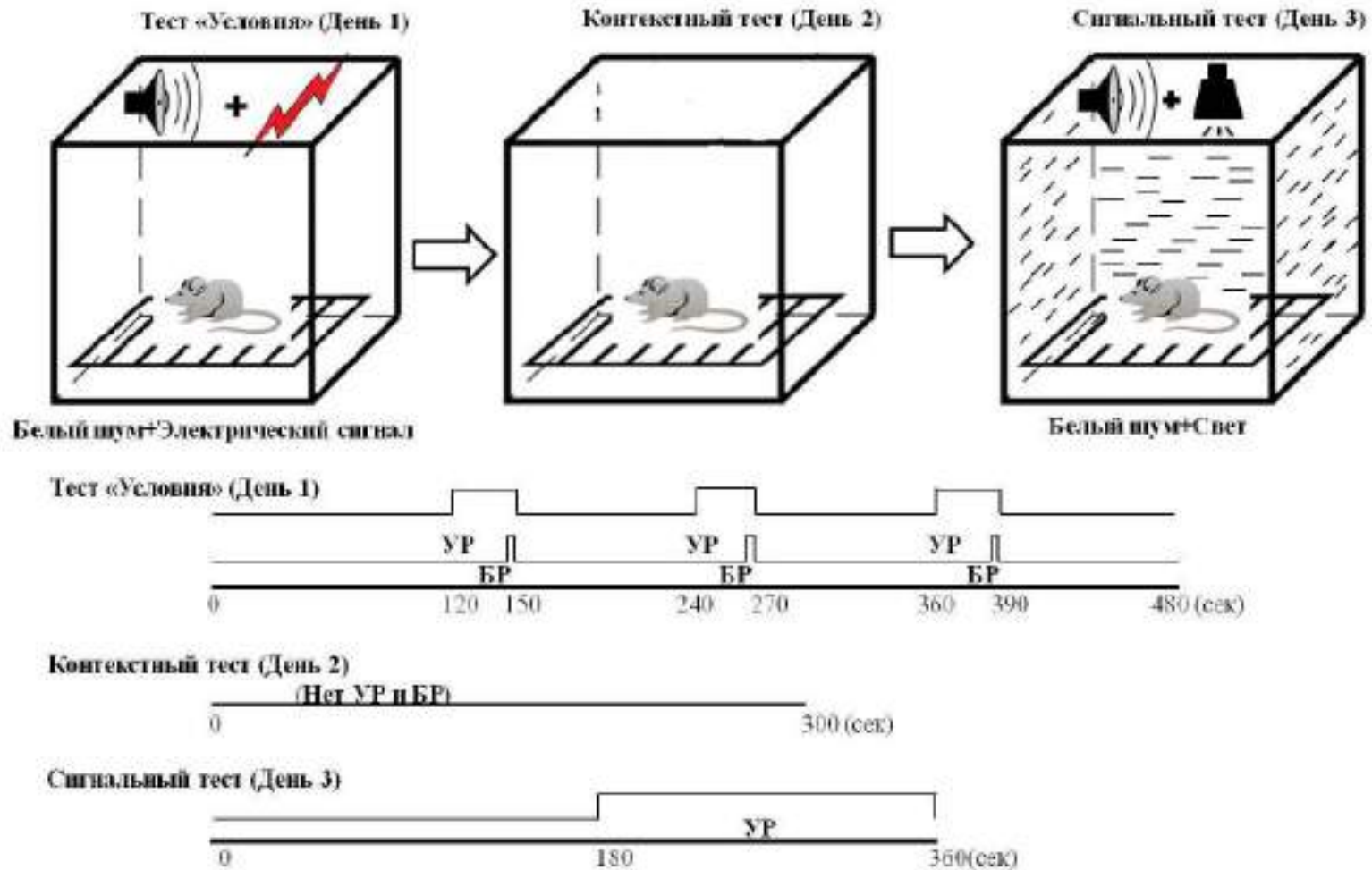


Рисунок 18 – Дизайн нейropsиxического тестирования «Fear conditioning». Белый шум – условный раздражитель (УР), электрический сигнал (0,3мА) – безусловный раздражитель (БР)

2.5 Иммуногистохимическое исследование

После проведения нейрореповеденческого тестирования осуществляли транскардиальную перфузию 0,1 М фосфатно-солевым буфером pH 7,4 (PBS, Sigma-Aldrich, США), а затем 4% параформальдегидом (PFA, Sigma-Aldrich, США) с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, после чего погружали в 20% раствор сахарозы.

С помощью микротомы Thermo Scientific Microm HM 650 изготавливали срезы толщиной 50 мкм. После этого срезы с помощью кисточки помещали в лунки 12-луночного планшета, заполненные 0,1 М фосфатно-солевым буфером.

Изучали экспрессию маркеров методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов [222].

Полученные срезы промывали в фосфатно-солевом буфере (по 1000 мкл в каждую лунку 3 раза по 5 мин), блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином (BSA, Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-солевом буфере и 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) (по 1000 мкл в каждую лунку) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем промывали смесью фосфатно-солевого буфера и 0,2% Triton X-100 (по 1000 мкл в каждую лунку 3 раза по 5 мин), инкубировали в течение ночи с первичными антителами, титр которых брали с учетом рекомендаций производителя: 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, GSK3-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 1-42A, 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) 1:1000 с 3% бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере и 0,2% Triton X-100 при 4°C (по 1000 мкл в каждую лунку). Затем срезы инкубировали 2 ч при комнатной температуре, после промывали смесью фосфатно-солевого буфера и 0,2% Triton X-100 (по 1000 мкл в каждую лунку 3 раза по 5 мин). Далее срезы инкубировали со вторичными антителами Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 555 (Abcam, ab 150074) 1:1000, Goat anti-guinea pig Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A11073) 1:1000, Chicken anti-mouse Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, C47393) в течение 2 ч при комнатной температуре, затем промывали смесью фосфатно-солевого буфера и 0,2% Triton X-100 (по 1000 мкл в каждую лунку 3 раза по 5 мин). Наносили монтирующую жидкость Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (Abcam, ab104139). Накрывали срез покровным стеклом и микроскопировали с использованием конфокального микроскопа Olympus FV 10i.

Экспрессию маркеров инсулинорезистентности в нейронах миндалевидного тела и гиппокампе головного мозга оценивали путем подсчета клеток (количество клеток/поле зрения) в трех полях зрения (100 x100 мкм). Локализацию IRAP, MAPK, PKC, GSK3-beta, IRS1 определяли в цитоплазме NeuN-позитивных нейронов миндалевидного тела, а также IRAP в цитоплазме астроцитов миндалевидного тела. Локализацию IRS1и IR определяли в цитоплазме NeuN-позитивных нейронов в гиппокампе головного мозга.

Экспрессию CD31 определяли в церебральных микрососудах в гиппокампе головного мозга. Локализацию Fe65, Abeta и RAGE определяли в цитоплазме CD31-позитивных клеток эндотелия церебральных микрососудов в гиппокампе головного мозга.

При проведении иммуногистохимических исследований в каждой группе было по 10 животных. От каждого животного отбирали по 5 срезов головного мозга. Подсчет клеток в каждом срезе в области миндалевидного тела и гиппокампа осуществляли в трех полях зрения (100×100 мкм). В каждом поле зрения наблюдали 8–10 клеток. Общее количество клеток в выборке по каждой группе составило 350–400 (10 животных \times 5 срезов \times 3 поля зрения \times 8–10 клеток = 1200–1500 клеток/выборка).

2.6 Иммуноферментный анализ

Для определения уровня инсулина и лактата были забраны образцы тканей гиппокампа, миндалевидного тела и ольфакторной луковицы головного мозга животных. Предварительно проводили анестезию с использованием хлоралгидрата, который вводили интраперитонеально в дозе 100 мг/кг веса животного.

Гиппокамп, миндалевидное тело и ольфакторную луковицу извлекали в соответствии со стереотаксическими координатами [255]. Образцы гомогенизировали в 10мМ Tris-base (pH 7.4) с помощью стеклянного гомогенизатора. В свежеприготовленном гомогенате определяли уровень инсулина и лактата с использованием иммуноферментного набора реагентов (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA kit; L-Lactate Assay Kit Colorimetric/Fluorometric). Измерение белков проводили с применением набора реагентов Bio-Rad protein assay kit и с бычьим сывороточным альбумином, используя его для приготовления стандартов (Bio-Rad, Hercules, CA, США).

2.7 Оценка митохондриального трансмембранного потенциала

Проводили с использованием иммуноферментного набора MITOISO2 (Sigma Aldrich, США), который позволяет выделить из нервных клеток обогащенные митохондриями фракции и оценить их активность путем измерения интенсивности флуоресценции красителя JC-1 (5,5',6,6'-тетрохлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензими-дазолилкарбоцианин йодид).

Принцип определения заключается в приготовлении гомогената гиппокампа головного мозга с последующим применением низкоскоростного ($600 \times g$) и высокоскоростного ($11,000 \times g$) центрифугирования. В результате получаемый осадок представляет собой фракцию митохондрий, которая обогащена только митохондриями, без содержания лизосом и пероксисом.

«Мягкие» ткани экстрагируются в присутствии делипидированного бычьего сывороточного альбумина для удаления свободных жирных кислот из ткани, которые могут вызвать разобщение дыхания в митохондриях. Присутствие в буфере этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) необходимо для хелатирования ионов Ca^{2+} , вызывающих набухание митохондрий.

Определение трансмембранного потенциала проводили согласно протоколу, представленному в наборе MITOISO2.

2.8 ПЦР анализ

Для оценки уровня экспрессии гена инсулина (insulin I (Ins1), gene ID - 16333, ensemble - ENSMUSG00000035804) в различных регионах головного мозга (гиппокамп, миндалевидное тело, ольфакторная луковица) у мышей

линии C57BL/6 с интрагиппокампальным введением бета-амилоида и ложно-оперированных животных использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК из образцов осуществляли с помощью набора реагентов «РНК-Экстран» (НПФ Синтол, Россия) по стандартному протоколу фирмы-изготовителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) при 40°C в течение 1 ч. Полученная кДНК использовалась для проведения ПЦР в режиме реального времени с помощью набора qPCRmix-NS (Евроген, Россия). Также использовались наборы праймеров и флуоресцентно-меченных ДНК-зондов для определения количества фрагментов кДНК инсулина, а также референсных генов GAPDH и АСТВ (ООО "ДНК-Синтез", Россия). При проведении ПЦР использовался амплификатор LightCycler 96, относительный количественный анализ экспрессии генов проводили с помощью программного обеспечения LightCycler 96 Software.

2.9 Электрофизиологическое исследование

Для проведения электрофизиологических исследований использовались коронарные срезы головного мозга. Для этого проводили анестезию путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в концентрации 400мг/кг веса животного. Далее осуществляли декапитацию, мозг помещали на 1 мин в ледяной (+4°C) раствор искусственной спинномозговой жидкости (иСМЖ), перфузируемой смесью газов 5% CO₂ и 95% O₂. Состав иСМЖ (в мМ): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 D-глюкоза. Далее от мозга отделялся мозжечок и фронтальная треть большого мозга. Фронтальные срезы, находящиеся в ледяной иСМЖ, получали с помощью вибротома Thermo Scientific Microm CU65. Для исследования целевых областей головного мозга – гиппокампа и миндалевидного тела – брали срезы

ткани головного мозга со стереотаксическими координатами Bregma -2,50 mm и Bregma -1,80 mm, соответственно. Инкубация готовых срезов в иСМЖ, перфузируемой смесью газов 5%CO₂ и 95% O₂, проходила в течение 1 ч при комнатной температуре.

Срез помещался в электрофизиологическую ванночку и омывался во время эксперимента иСМЖ с растворёнными в ней 5% CO₂ и 95% O₂. Исследовали основные электрофизиологические характеристики в виде суммарной возбудимости ограниченного количества нейронов разных зон головного мозга (полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы – пВПСП). Регистрация пВПСП производилась с помощью Cl-Ag электрода в стеклянной боросиликатной пипетке, заполненной иСМЖ. Стимуляция пресинаптических волокон производилась с помощью платино-иридиевого электрода с сопротивлением 5 МΩ. Запись потенциалов и стимуляция производилась с помощью усилителя НЕКА ЕРС10 USB с СА1 и СА3 областей гиппокампа и базолатерального комплекса миндалевидного тела. В каждой области гиппокампа и базолатеральном комплексе миндалевидного тела количество исследуемых зон составляло 10. Данные образования визуально определялись по характерным формам при увеличении объектива x10 (**рисунок 19**).

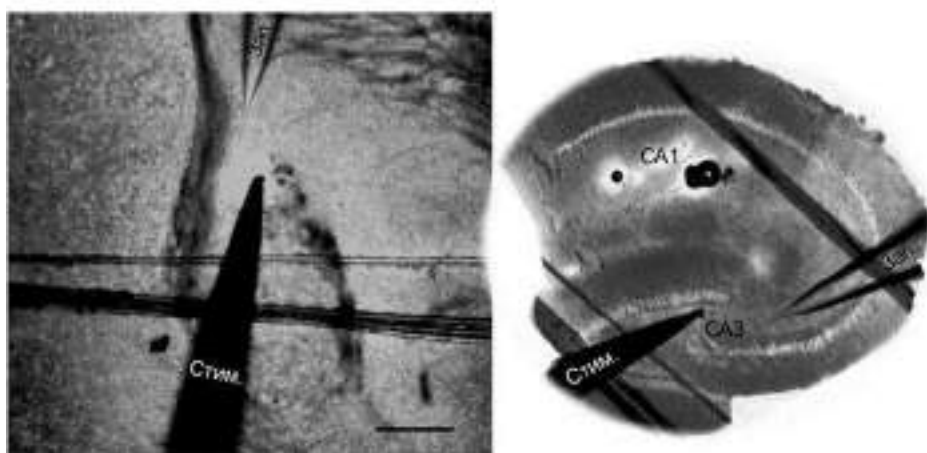


Рисунок 19 – Положение стимуляционного и записывающего электродов на миндалевидном теле (слева) и гиппокампе (справа)

На микрофотографиях представлены срез миндалевидного тела (слева) и гиппокамп (справа), где видны его основные области (в частности, СА1 и СА3). Стим. – положение стимуляционного платиново-иридиевого электрода для пресинаптических окончаний. Зап. – положение стеклянного записывающего электрода для регистрации пВПСП с дендритов нейронов базомедиальной зоны миндалевидного тела и СА3 области гиппокампа, соответственно. Размерная шкала 250μм.

Действие инсулина при однократном остром введении 500нМ инсулина *in vitro* на амплитуду пВПСП в виде её увеличения или уменьшения от точки 1 до точки 3 было показано с помощью нахождения коэффициента зависимости от времени угла наклона кривой амплитуд пВПСП относительно изолинии (100%, принятого за 0°) с помощью метода линейной регрессии. Количество исследуемых зон в СА1 и СА3 области гиппокампа составило 6, в базолатеральном комплексе миндалевидного тела – 5.

2.10 Оценка особенностей формирования сосудистой сети (ангиогенеза)

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 СА1, СА2, СА3, зубчатая извилина (DG).

2.11 Оценка проницаемости ГЭБ *in vivo*

Проводили путем оценки проницаемости красителя Evans blue в срезах головного мозга мышей через 4-5 ч после его внутривентрикулярного введения (2% раствор в 0,9% растворе NaCl, в объеме 4 мл/кг веса животного) по протоколу, описанному [514]. Животным проводили транскардиальную перфузию головного мозга 0,1 М фосфатно-солевым буфером pH 7,4, затем 4% раствором параформальдегида. Головной мозг фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 24 ч, далее опускали в 20% раствор сахарозы на 2 ч. Корональные срезы головного мозга толщиной 50 мкм получали на вибротоме Thermo Scientific Microm CU65. Далее с помощью полностью автоматизированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа с водной иммерсией Olympus FV10i-W (возбуждение 620 нм, эмиссия 680 нм) подсчитывали в процентах площадь флуоресценции красителя Evans blue от общей площади сосудов в поле зрения (по данным фазово-контрастной микроскопии).

2.12 Моделирование ГЭБ *in vitro*

Источником клеток служили животные: Мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте 4 месяцев. Группа C57BL/6+A β 1-42 – инъекционная модель болезни Альцгеймера (введение бета-амилоида (A β 1-42)) по 1 мкл в СА1 зону гиппокампа [255]. Группа C57BL/6+PBS – ложно-оперированные животные (введение фосфатно-солевого буфера (PBS)). В каждой группе было по 5-7 животных.

Клетки выделялись как от ложно-оперированных животных, так и от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера.

2.12.1 Получение клеток-компонентов ГЭБ и НВЕ

Выделение церебральных эндотелиоцитов проводилось по модифицированному протоколу [488]. Выделение коры головного мозга и удаление крупных сосудов осуществляли в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Центрифугирование мелконарезанной коры головного мозга проводили в течение 3 мин при 150g и 20°C. Затем к осадку добавляли 25% раствор фетальной бычей сыворотки (FBS, HyClone, США) в соотношении 1:2, тритуровали 25 раз с помощью пипетки на 5 мл. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 600g и 20°C. Далее проводили забор нижнего слоя и переносили коническую пробирку на 15 мл. Процедуру тритурования и центрифугирования повторяли 3 раза, после чего проводили ферментативную обработку пеллета в соотношении 1:2 (по отношению к объему пеллета) 0,1% раствором коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин при 37°C с периодическим перемешиванием. Затем проводили ресуспензирование осадка и центрифугирование при 150g в течение 5 мин. Культивирование эндотелиальных клеток осуществляли при 5% CO₂ и 37°C, в культуральных флаконах, покрытых желатином (Gelatin Solution 0,1%, Biological Industries, США) в культуральной среде, состоящей из DMEM (ПанЭко, Россия), 20% раствора FBS (ПанЭко, Россия), глюкозы 3 мг/мл (Sigma-Aldrich, США), глутамина 0,58 мг/мл (Sigma-Aldrich, США), стрептомицина 100 мг/мл, пенициллина 100 ЕД/мл (HyClone, США). Смену среды проводили 1 раз в 2 дня. По достижении 90% конfluence проводили удаление среды. Клетки во флаконе промывали раствором Хенкса

(ПанЭко, Россия) 2 раза и обрабатывали 0,25% раствором трипсина и ЭДТА (ПанЭко, Россия).

Выделение и культивирование нейросфер. Головной мозг помещали в 2% раствор глюкозы в PBS на холоду. Проводили выделение интересующих областей (гиппокамп, стенки боковых желудочков), иссекали их до 1 мм³. После выделенную ткань головного мозга переносили в свежий 2% раствор глюкозы в PBS (в конической пробирке на 14 мл) на 1 мин. После осаждения ткани супернатант удаляли, а оставшуюся ткань ресуспензировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США). Затем проводили тритурацию ткани 25 раз с помощью стерильного пластикового наконечника до получения однородной суспензии клеток. Далее к полученной суспензии клеток добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. По истечении 2 мин собирали супернатант и переносили его в новую коническую пробирку на 14 мл, центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, затем супернатант удаляли и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией.

Подсчет количества клеток проводили с помощью цитометра Scepter Cell Counter. Клетки в количестве $1,5 \times 10^6$ 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 [14]. В качестве основной культуральной среды использовали NeuroCult NS-A Proliferation Kit, с добавлением основного фактора роста фибробластов – bFGF, эпидермального фактора роста – EGF и гепарина [282]. Клетки в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл сеяли в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл среды NeuroCult NS-A Differentiation Kit. Затем осуществляли дифференцировку нейросфер в астроциты и нейроны в культуральной среде NeuroCult NS-A Differentiation Kit [14].

2.12.2 Получение модели ГЭБ и нейроваскулярной единицы *in vitro*

Смесь астроцитов и нейронов помещали на дно культурального планшета, далее проводили установку культуральной вставки (Corning-Costar, США), на которую затем помещали эндотелиоциты. Для получения модели нейроваскулярной единицы (НВЕ) эндотелиоциты культивировали вместе с нейронами и астроцитами (в соотношении количества клеток 1:1:2, соответственно) в культуральном планшете. Затем смесь клеток культивировали в среде, состоящей из DMEM (ПанЭко, Россия), 20% раствора FBS (ПанЭко, Россия), глутамин 0,58 мг/мл (Sigma-Aldrich, США), стрептомицина 100 мг/мл, пенициллина 100 ЕД/мл (HyClone, США) с 5% CO₂ при 37°C.

Эндотелиальные клетки, астроциты и нейроны фенотипировали поликлональными антителами по стандартному протоколу иммуногистохимии [222] с использованием первичных антител ZO1 (Zonula occludens-1, Santa Cruz Biotechnology, sc-8147, goat polyclonal) 1:500, GFAP (Glial fibrillary acidic protein, Abcam, ab4674, chicken polyclonal) 1:500, NSE (Neuron-specific enolase, Abcam, ab79757, rabbit monoclonal) 1:500 и вторичных антител Alexa Fluor (Abcam) 1:500 с последующей микроскопией на микроскопе ZOE.

2.12.3 Разработка статической и динамической модели ГЭБ *in vitro*

Материалом для создания моделей ГЭБ *in vitro* служили первичные культуры клеток астроцитов, нейронов и церебральных эндотелиоцитов, выделенные из головного мозга эмбрионов мыши линии C57BL/6 по описанной

ранее методике. После получения культур клеток-компонентов моделировали статические и динамические модели ГЭБ.

При создании статической модели ГЭБ *in vitro* использовали 24-луночный планшет (Corning, США), на дно которого засеивали нейроны и астроциты в количестве $1,5 \cdot 10^5$ клеток в каждую лунку. Затем церебральные эндотелиоциты добавляли на культуральные вставки в количестве $1 \cdot 10^5$ клеток в каждую вставку. После этого проводили сокультивирование клеток-компонентов ГЭБ в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% раствором FBS (ПанЭко, Россия), 100 мкг/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, США), 0,58 мг/мл глутамин (Sigma-Aldrich, США) в условиях CO₂-инкубатора. Для моделирования экспериментальной болезни Альцгеймера в статической модели ГЭБ *in vitro* к клеткам добавляли A β 1-42 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ в питательной среде. Время культивирования составило 48 ч.

В эксперименте были использованы два варианта динамической модели ГЭБ *in vitro*:

1) коммерческая закрытая система для микроперфузии CellASIC ONIX (Merck Millipore, США);

2) 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. При этом как нейроны, так и астроциты отделяли от церебральных эндотелиоцитов с помощью мембраны рабочей камеры. Соотношение нейронов, астроцитов и церебральных эндотелиоцитов составило 1:2:1, соответственно. Проводили культивирование клеток в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% раствором FBS (ПанЭко, Россия), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, США), 0,58 мг/мл глутамин (Sigma-Aldrich, США), при 37°C, 5% CO₂ и скорости потока культуральной среды 1,25 мкл/ч в течение 48 ч. Для моделирования

экспериментальной болезни Альцгеймера в динамической модели ГЭБ *in vitro* к клеткам добавляли А β 1-42 (Sigma-Aldrich, США) 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 (Швейцария). При этом использование шприцов различного диаметра позволяло проводить эксперименты с применением разной скорости потоков. Присоединение шприцов с обратной стороны каретки насоса позволяло получать систему, в которой удаление жидкости из открытой камеры проходило синхронизировано с ее подачей. Апробацию системы проводили в течение 2-х сут. В связи с разницей рабочих объемов лунок в 24-луночной планшете и системе ONIX, скорость потока среды увеличивали до 1,5 мкл/мин.

Применение открытой системы дало возможность осуществить регистрацию ТЭС, что в свою очередь нельзя реализовать при использовании закрытой системы.

Разработанные нами модели ГЭБ *in vitro* (статическая и два варианта динамической моделей) продемонстрировали возможность применения их для изучения механизмов повреждения ГЭБ *in vitro*. Ключевым отличием разработанных моделей от других существующих конфигураций является то, что новые модели позволяют воспроизводить цитотоксические эффекты бета-амилоида *in vitro*, характерные для церебральной амилоидной ангиопатии, а также демонстрируют скомпрометированные RAGE- опосредованные механизмы сигнальной трансдукции (при применении siRNA-индуцируемого нокдауна соответствующих генов), существенные для развития повреждения ГЭБ при хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа.

2.12.4 Иммуногистохимическое исследование

Проводили в статической и динамической моделях ГЭБ *in vitro*. Фенотипирование эндотелиальных клеток осуществляли с использованием первичных антител ZO1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8147, goat polyclonal) 1:500, астроцитов GFAP (Abcam, ab4674, chicken polyclonal) 1:500, нейронов NSE (Abcam, ab79757, rabbit monoclonal) 1:500 и вторичных антител Alexa Fluor (Abcam) 1:500 в соответствии с протоколом иммуногистохимии [268].

Для оценки экспрессии следующих целевых молекул – RAGE, VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2), JAM1 и ZO1 были сформированы 4 экспериментальные группы:

1) контрольная I – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях статической модели ГЭБ;

2) опытная I – эндотелиоциты, которые культивировались в статической модели ГЭБ в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 (моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера);

3) контрольная II – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях закрытой динамической модели ГЭБ;

4) опытная II – эндотелиоциты, которые культивировались в условиях закрытой динамической модели ГЭБ в присутствии 10 мкМ Аβ 1-42 (моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера).

Для анализа экспрессии целевых молекул: RAGE (Abcam, ab3611, rabbit monoclonal), VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2, Abcam, ab2349, rabbit polyclonal), JAM1 (Abcam, ab52647, rabbit monoclonal), ZO1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8147, goat polyclonal) использовали стандартный протокол иммуноокрашивания [268]. Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:500, инкубацию проводили в течение 18 ч при 4°C. Вторичные антитела Alexa Fluor (Abcam) использовали в разведении 1:500,

время инкубации составляло 2 ч при 37°C. Микроскопию клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа ZOE. Осуществляли подсчет количества позитивных клеток для каждого вида антигена в образце (не менее 10 полей зрения). При обработке полученных результатов принимали во внимание относительное количество всех клеток, которые несли целевую метку/метки. Выражали в процентах от общего количества клеток.

2.13 Регистрация трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС)

Для измерения ТЭС использовали эпителиальный вольтметр EVOM2 и электрод STX2. Регистрацию ТЭС осуществляли при формировании модели ГЭБ *in vitro* в 4-х экспериментальных группах:

1) контрольная I – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях статической модели ГЭБ;

2) опытная I – эндотелиоциты, которые культивировались в статической модели ГЭБ в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 (моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера);

3) контрольная III – интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ;

4) опытная III – эндотелиоциты, которые культивировались в условиях открытой динамической модели ГЭБ в присутствии 10 мкМ Аβ 1-42 (моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера).

2.14 Модуляция экспрессии RAGE и регистрация ТЭС

Для блокировки экспрессии RAGE в клетках эндотелия использовали siRNA RAGE (Santa Cruz, sc-35299).

Трансфекцию siRNA проводили методом электропорации с применением системы трансфекции Nucleofector 2b Device (Lonza, Швейцария) и набора Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Endothelial Cells (Lonza, Швейцария) согласно протоколу, который рекомендован фирмой-производителем.

Для химической модуляции RAGE использовали мышиный A β 1-42 (Sigma, США) в конечной концентрации 1мкМ, инкубацию проводили в течение 1 ч.

Формирование экспериментальных групп.

Были сформированы 2 основные группы: 1 группа – клетки, которые были выделены от ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS); 2 группа – клетки, которые были выделены от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42). 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.

Регистрацию ТЭС проводили с использованием эпителиального вольтметра EVOM2 и электрода STX2 для каждой группы при формировании модели ГЭБ *in vitro*, а также через 1, 2, 4, 6 и 24 ч.

2.15 Оценка проницаемости ГЭБ *in vitro*

Оценку проницаемости ГЭБ проводили с помощью регистрации концентрации FITC-меченого декстрана с молекулярной массой 20,000 (Sigma, США) в среде из разных компартментов лунок культурального планшета с использованием спектрофлуориметра CM 2203 при длине волны – 488/520 нм.

Исследование проводили на экспериментальных группах, представленных в п. 2.13.

Формирование модели ГЭБ *in vitro* осуществляли в 24-луночном планшете. Нейроны и астроциты засеивали на дно лунок. Эндотелиоциты засеивали на культуральную вставку. Когда достигала полная конfluence клеток, вставки с эндотелиоцитами устанавливали в культуральные планшеты, на дне которых находились нейроны и астроциты. В объем культуральной среды культуральной вставки вносили FITC-меченый декстран в концентрации 30мг/мл. Образцы культуральной среды собирали из нижней части планшета (среда, в которой находились нейроны и астроциты), а также из верхней части (среда, где находились эндотелиоциты). Образцы собирали через 1, 2 и 4 ч, затем проводили определение концентрации декстрана.

2.16 Оценка особенностей ангиогенеза и иммуногистохимическая регистрация целевых молекул

Исследование было проведено на экспериментальных группах, представленных в п. 2.13.

Для оценки особенностей ангиогенеза проводили регистрацию целевых молекул в клетках эндотелия использовали первичные антитела к CD34 (Abcam, ab81289, rabbit monoclonal), VEGFR2 (Abcam, ab2349, rabbit polyclonal).

Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:300. Время инкубации составляло 18 ч при 4°C.

Вторичные антитела Alexa 488 (Invitrogen, A11034) использовали в разведении 1:500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C.

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE. Выполняли подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих каждый из видов антигена в образце при анализе не менее 10 полей зрения. При обработке результатов учитывалось относительное количество всех клеток, несущих интересующую метку/метки и выраженное в процентах от общего количества клеток.

2.17 Статистический анализ

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы “GraphPad Prism 8.0.1 (версия 8.0, США).

Критерий Колмагорова-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* × *Возраст*, *Генотип* × *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 $P \leq 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Особенности реализации эмоций и когнитивных функций у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера

Высокая концентрация бета-амилоида ($A\beta$ 1-42) ($>$ наномолярной), которая может иметь хронический характер (в случае генетической модели болезни Альцгеймера) или возникает в результате однократного введения (интрагиппокампальная инъекция бета-амилоида), оказывает негативное воздействие на структурно-функциональную целостность нейронов и синаптическую пластичность [259, 419, 805]. Более того, патологическое воздействие бета-амилоида может сильно повлиять на поведение, в том числе на процессы обучения и запоминания [628, 697].

Важно отметить, что генетическая модель болезни Альцгеймера представляет собой ценный ресурс для изучения механизмов, лежащих в основе патогенеза и прогрессирования заболевания, при этом сверхэкспрессия генов, связанных с развитием нейродегенерации альцгеймеровского типа, может оказывать влияние на функцию нервных клеток посредством множества механизмов, часть из которых может не находиться в тесной взаимосвязи с бета-амилоид-индуцированным развитием заболевания [123, 397]. Для дифференцирования бета-амилоид-специфических эффектов от эффектов сверхэкспрессии генов (в частности, APP и PSEN1), осуществляют моделирование болезни Альцгеймера путем интрагиппокампальной инъекции бета-амилоида, тем самым воспроизводя модель острой бета-амилоид-индуцированной патологии. При этом учитывается негативное влияние бета-амилоида на показатель долговременной потенциации [375], что сопряжено с нарушением процессов запоминания и различных видов памяти по мере прогрессирования заболевания, предполагая, что бета-амилоид играет главную роль в нарушении памяти в целом.

Поэтому мы изучили развитие когнитивных и социальных нарушений по мере прогрессирования заболевания у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера.

3.1.1 Результаты нейроповеденческого тестирования «Fear conditioning»

Эмоциональную память, за реализацию которой в большей степени ответственна такая важная область головного мозга как миндалевидное тело, анализировали у мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+A β 1-42), когда реализуется острое нейротоксическое действие данного пептида.

Животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+A β 1-42, n=5) демонстрировали менее длительное время замирания по сравнению с группой ложно-оперированных животных (CD1+PBS, n=5) (**рисунок 20**). При этом на протяжении всего периода тестирования (с 1 по 3 день) у мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера не наблюдалось формирования условного рефлекса.

Так, в первый день (*Тест «Условия»*) тестирования, когда подавался белый шум (условный раздражитель) и электрический сигнал (безусловный раздражитель), время замирания (здесь и далее время представлено в сек) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+A β 1-42) статистически значимо не отличалось ($P=0,5318$) от ложно-оперированных животных (CD1+PBS) (**рисунок 20**).

При этом во второй день тестирования (*Контекстный тест*), когда отсутствовал как условный, так и безусловный раздражитель, у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+A β 1-42) было

зафиксировано значимое ($P=0,0219$) снижение времени замирания по сравнению с ложно-оперированными животными (**рисунок 20**).

В третий день тестирования (*Сигнальный тест*), когда были созданы новые условия в испытательной камере (изменение цвета стен и пола) и осуществлялась подача белого шума без подкрепления электрическим сигналом, было выявлено, что время замирания у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера значимо ($P=0,048$) меньше по сравнению с ложно-оперированными животными (**рисунок 20**).

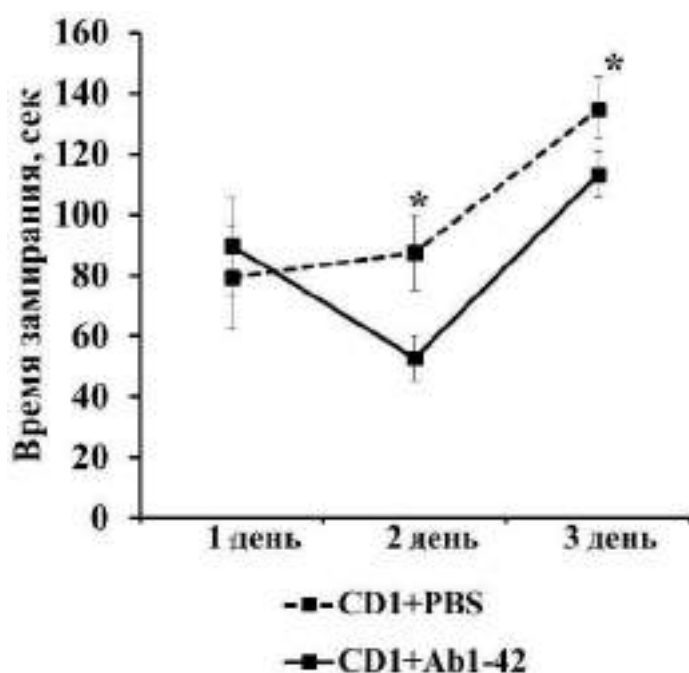


Рисунок 20 – Поведение животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab β 1-42) и ложно-оперированных животных (CD1+PBS) в тесте «Fear conditioning»

(* $P<0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean \pm S.E.M., n=10.

В совокупности, у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера не формировался условный рефлекс (замирание) в ответ на неприятный стимул, что указывало на нарушении ассоциативного обучения и запоминания в условиях «подострого» токсического действия бета-амилоида.

Далее нам стало интересно изучить другие аспекты поведения, а именно, развитие когнитивных и социальных нарушений как на ранней стадии, так и при прогрессировании заболевания у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799).

3.1.2 Результаты нейроповеденческого тестирования «Распознавание нового объекта»

Для исследования определенных изменений рабочей памяти, а также внимания, тревоги, предпочтения новизны использовали тест «Распознавание нового объекта».

Для количественной оценки в тесте были определены такие параметры, как индекс различия (DI) и индекс распознавания (RI).

Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений показал взаимное влияние *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,29)}=8,58$, $P=0,0065$) на индекс различия (DI), а также выявлено значимо влияние фактора *Генотип* ($F_{(1,29)}=6,46$, $P=0,0167$) и фактора *Возраст* ($F_{(1,29)}=21,81$, $P<0,0001$).

Индекс различия у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799, $n=10$) в возрасте 4 месяцев значимо не отличался ($P=0,9929$) от животных контрольной группы (линии C57BL/6, $n=10$) в возрасте 4 месяцев (**рисунок 21 А**). Иная ситуация наблюдалась у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) в возрасте 12 месяцев: индекс различия значимо ($P=0,0026$) меньше ($-0,24\pm 0,06$) как по сравнению с животными контрольной группы (линии C57BL/6) ($0,30\pm 0,08$) в аналогичном возрасте, так и с животными с генетической моделью болезни Альцгеймера в возрасте 4 месяцев (**рисунок 21 А**).

Отрицательное значение данного индекса у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера указывает на большее время, проведенное с уже знакомым объектом.

Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений не выявил взаимного влияние *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,29)}=2,82$, $P=0,1041$) на индекс распознавания (RI), однако показал значимое влияние фактора *Генотип* ($F_{(1,29)}=13,18$, $P=0,0011$) и фактора *Возраст* ($F_{(1,29)}=31,16$, $P<0,0001$).

Так, индекс распознавания у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) в возрасте 4 месяцев значимо не отличался ($P=0,5330$) от животных контрольной группы (линии C57BL/6) в возрасте 4 месяцев (**рисунок 21 Б**). Однако по мере прогрессирования заболевания (в возрасте 12 месяцев) у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) индекс распознавания составил ($0,38\pm 0,03$), что статистически значимо ($P=0,0036$) меньше, чем у животных контрольной группы (линии C57BL/6) ($0,62\pm 0,09$) и животных с генетической моделью болезни Альцгеймера в возрасте 4 месяцев ($0,71\pm 0,05$) при $P<0,0001$ (**рисунок 21 Б**).

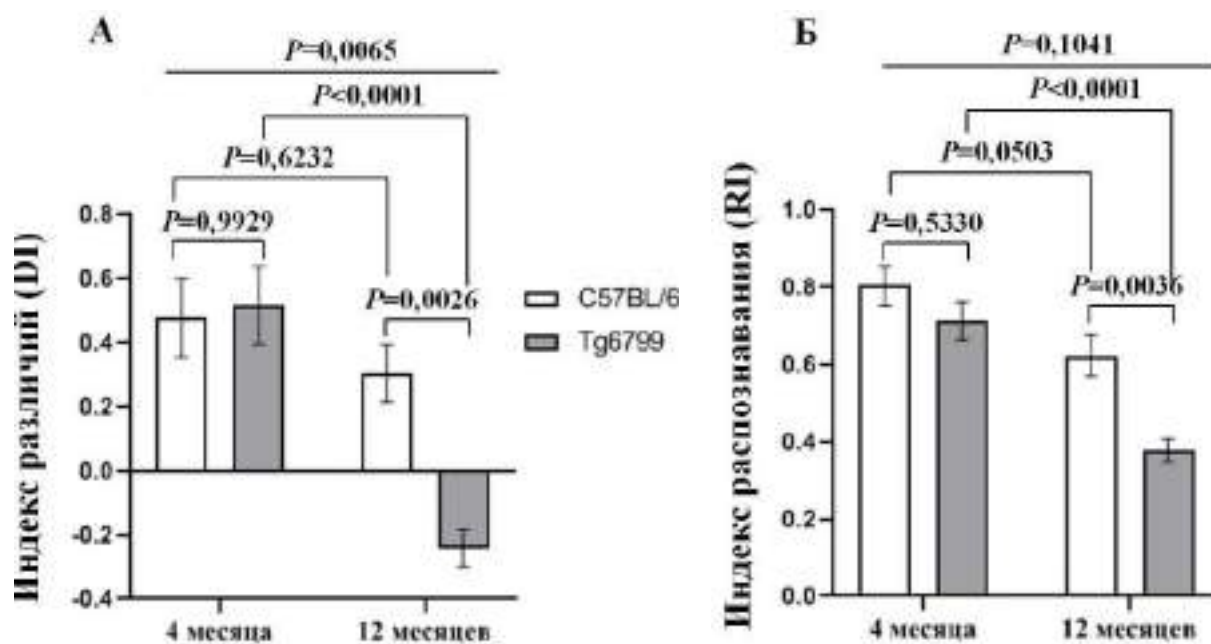


Рисунок 21 – Поведение животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 и 12 месяцев и животных контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 4 и 12 месяцев в тесте «Распознавание нового объекта»

(А) Индекс различий, непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,29)}=8,58$, $P=0,0065$), фактор *Генотип* ($F_{(1,29)}=6,46$, $P=0,0167$ и фактор *Возраст* ($F_{(1,29)}=21,81$, $P<0,0001$). (Б) Индекс распознавания, непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, фактор *Генотип* ($F_{(1,29)}=13,18$, $P=0,0011$) и фактор *Возраст* ($F_{(1,29)}=31,16$, $P<0,0001$). Данные представлены в виде Mean±S.E.M.

Это указывает на более высокую способность запоминать у мышей контрольных групп, чем у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера.

3.1.3 Результаты нейроповеденческого тестирования «Черно-белая камера»

Для изучения определенных эмоциональных состояний (склонность к тревоге, страху, ярости, депрессии) использовали тест «Черно-белая камера».

Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений показал отсутствие взаимного влияния *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,36)}=1,28$, $P=0,2656$) на время нахождения в светлой камере. Однако выявлено значимо влияние фактора *Генотип* ($F_{(1,36)}=8,00$, $P=0,0076$) и фактора *Возраст* на время нахождения в светлой камере ($F_{(1,36)}=22,42$, $P<0,0001$).

У животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799, n=10) в возрасте 4 месяцев время нахождения в светлой камере (здесь и далее время представлено в сек) ($216,41\pm 21,98$) значимо не отличалось ($P=0,6305$) от животных контрольной группы (линии C57BL/6, n=10) ($185,89\pm 18,02$) в возрасте 4 месяцев (**рисунок 22 А, рисунок 23 А**). Тогда как в возрасте 12 месяцев у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799, n=10) наблюдалось значимое различие ($P=0,0390$) по времени проведения в светлой камере ($321,86\pm 25,08$) по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6, n=10) ($250,68\pm 10,36$) в возрасте 12 месяцев (**рисунок 22 Б, рисунок 23 А**). Также стоит отметить, что время нахождения в светлой камере мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера в возрасте 12 месяцев ($321,86\pm 25,08$) значимо изменилось ($P=0,0011$) по сравнению с животными линии Tg 6799 в возрасте 4 месяцев ($216,41\pm 21,98$) (**рисунок 22 А-Б, рисунок 23 А**).

Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений выявил взаимное влияние *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,36)}=4,79$, $P=0,0352$) на число входов в черную камеру. При этом отдельно фактора *Генотип* ($F_{(1,36)}=0,11$, $P=0,7372$) и

фактор *Возраст* ($F_{(1,36)}=0,64$, $P=0,4285$) на число входов в черную камеру значимого влияния не оказывали.

Так, число входов в черную камеру у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 месяцев ($32,90 \pm 4,54$) не отличается ($P=0,5635$) от животных контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 4 месяцев ($27,70 \pm 2,54$) (рисунок 23 Б). С возрастом (в 12 месяцев) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) число входов в черную камеру ($24,50 \pm 1,41$) значимо не изменилось ($P=0,2961$) как по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 12 месяцев ($31,60 \pm 1,59$), так и по сравнению с животными с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 месяцев ($32,90 \pm 4,54$) при $P=0,1680$, хотя наблюдали более меньшее количество входов по мере прогрессирования заболевания (рисунок 23 Б).



Рисунок 22 – Образцы трек в тесте «Черно-белая камера» животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) и животных контрольной группы (линия C57BL/6). (А) в возрасте 4 месяцев; (Б) в возрасте 12 месяцев.

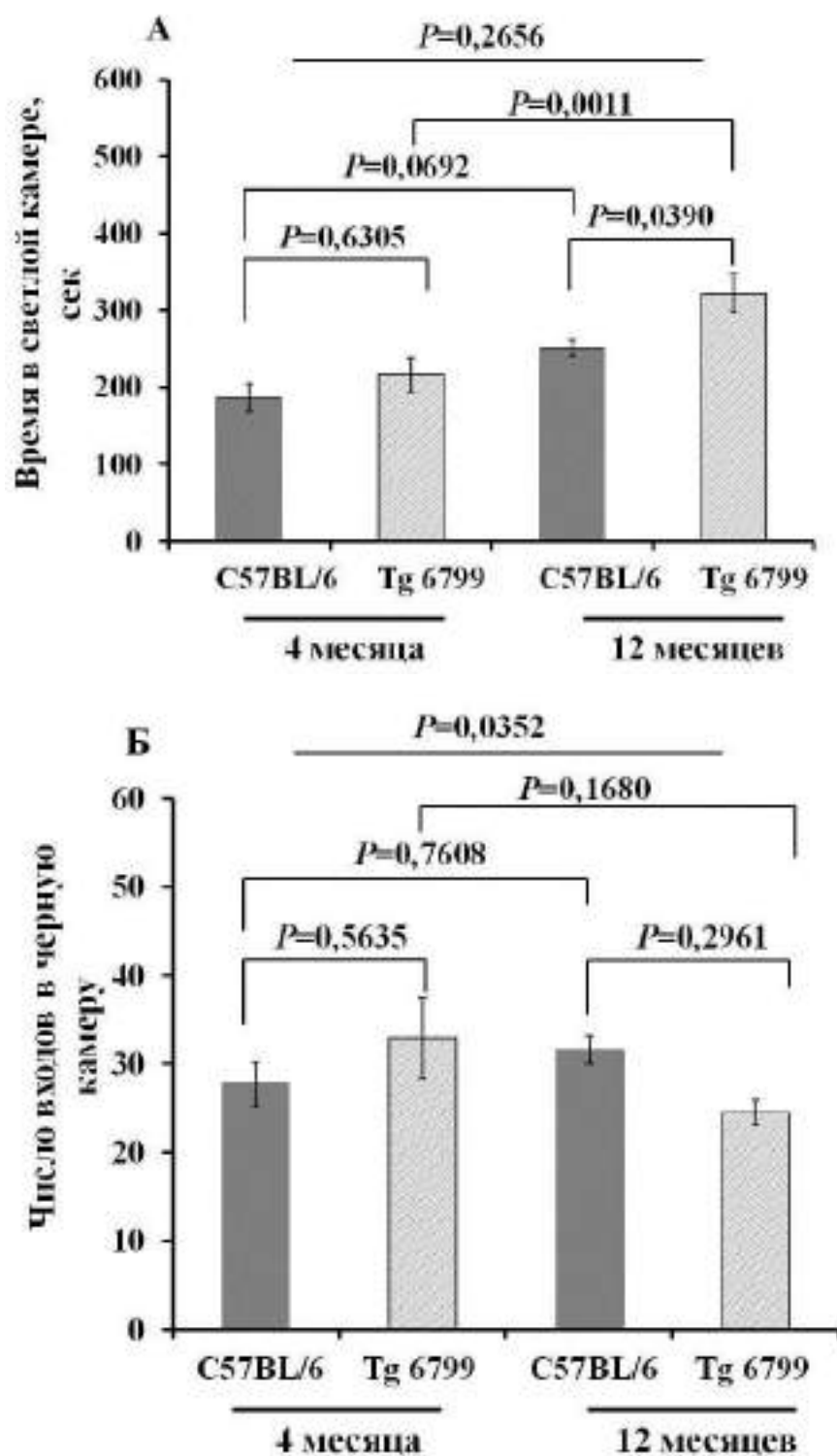


Рисунок 23 – Поведение животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 и 12 месяцев и животных контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 4 и 12 месяцев в тесте «Черно-белая камера»

(А) Время нахождения в светлой камере, непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, влияние фактора *Генотип* ($F_{(1,36)}=8,00$, $P=0,0076$) и фактора *Возраст* ($F_{(1,36)}=22,42$, $P<0,0001$). (Б) Число входов в темную камеру, непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, взаимное влияние *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,36)}=4,79$, $P=0,0352$). Данные представлены в виде Mean±S.E.M.

В совокупности эти наблюдения указывают на проявление тревоги и заторможенности у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера при развитии заболевания.

3.1.4 Результаты нейроповеденческого тестирования «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» использовали как преимущественно классический для изучения степени тревожности у животных, и в дополнение к тесту «Черно-белая камера» для лучшего понимания особенностей поведения.

Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений показал как отсутствие взаимного влияния *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,36)}=1,87$, $P=0,1798$), так и фактора *Генотип* ($F_{(1,36)}=0,06$, $P=0,8052$) на пройденную дистанцию. Однако выявлено значимо влияние фактора *Возраст* на пройденную дистанцию ($F_{(1,36)}=7,65$, $P=0,0090$).

Так, пройденная дистанция (здесь и далее дистанция представлена в м) животными с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799,

n=10) в возрасте 4 месяцев ($19,63 \pm 1,94$) значимо не отличалась ($P=0,8623$) от пройденной дистанции животными контрольной группы (линия C57BL/6, n=10) ($21,99 \pm 3,18$) в возрасте 4 месяцев (**рисунок 24 А**). В возрасте 12 месяцев мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799, n=10) прошли дистанцию ($16,68 \pm 1,68$), не отличающуюся как от группы контрольных животных (линия C57BL/6, n=10) в возрасте 12 месяцев ($13,27 \pm 1,28$) при $P=0,6559$, так и от животных с генетической моделью болезни Альцгеймера в возрасте 4 месяцев ($19,63 \pm 1,94$) при $P=0,7644$ (**рисунок 24 А**). При этом животные контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 12 месяцев прошли значимо ($P=0,0266$) меньшую дистанцию ($13,27 \pm 1,28$) по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 4 месяцев ($21,99 \pm 3,18$) (**рисунок 24 А**).

Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений показал как отсутствие взаимного влияния *Генотип* × *Возраст* ($F_{(1,36)}=2,20$, $P=0,1470$), так и фактора *Возраст* ($F_{(1,36)}=0,01$, $P=0,9271$) на время, проведенное в открытых рукавах. В то же время выявлено, что фактор *Генотип* ($F_{(1,36)}=29,54$, $P < 0,0001$) оказывает значимое влияние на время, проведенное в открытых рукавах.

При анализе времени нахождения в закрытых рукавах непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений показал как отсутствие взаимного влияния *Генотип* × *Возраст* ($F_{(1,36)}=2,49$, $P=0,1234$), так и фактора *Возраст* ($F_{(1,36)}=0,96$, $P=0,3342$), при этом фактор *Генотип* ($F_{(1,36)}=42,29$, $P < 0,0001$) оказывает значимое влияние.

Так, мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 месяцев значимо ($P=0,0475$) больше времени (здесь и далее время представлено в сек) проводили в открытых рукавах ($156,47 \pm 44,05$) по сравнению с животными контрольной группы в аналогичном возрасте (линия C57BL/6) ($52,78 \pm 13,75$), и, соответственно, значимо ($P=0,0069$) меньше

времени ($329,37 \pm 42,86$) проводили в закрытых рукавах по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 4 месяцев ($473,68 \pm 24,56$) (рисунок 25). Подобная ситуация у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) наблюдалась и по мере развития заболевания (в возрасте 12 месяцев): время, проведенное в открытых рукавах, ($197,83 \pm 28,87$) значительно больше ($P < 0,0001$) по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 12 месяцев ($16,25 \pm 8,45$), и, соответственно, значительно ($P < 0,0001$) меньше времени ($254,48 \pm 30,48$) проводили в закрытых рукавах по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 месяцев ($491,22 \pm 20,88$) (рисунок 25).

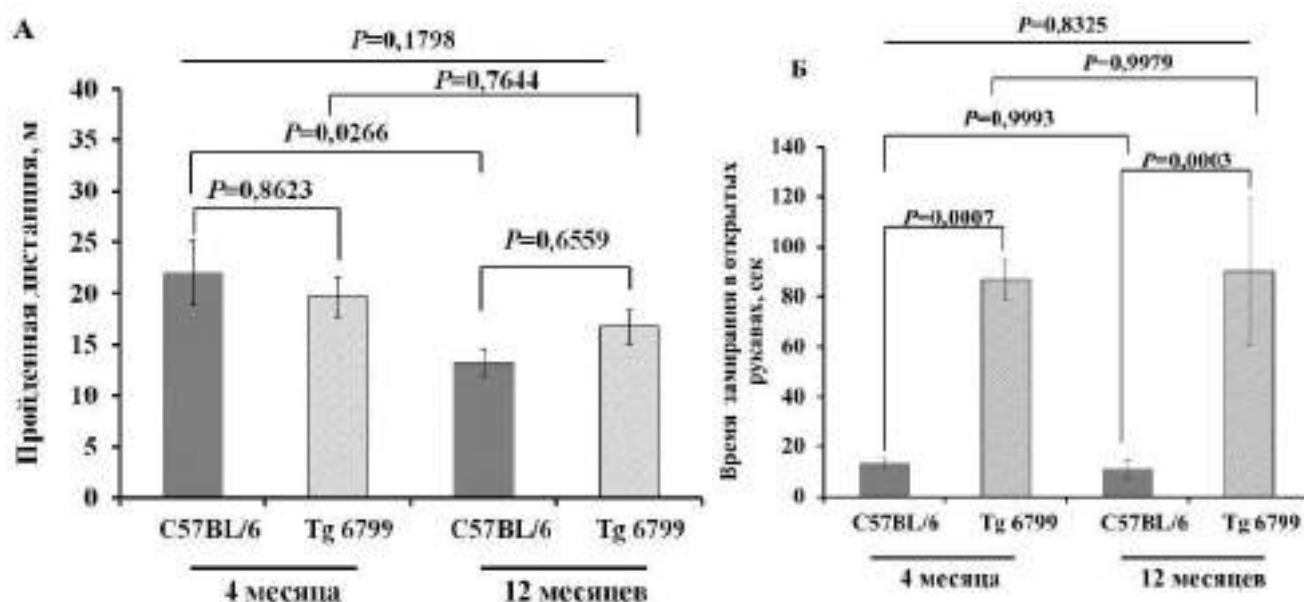


Рисунок 24 – Поведение животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 и 12 месяцев и животных контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 4 и 12 месяцев в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

(А) общая дистанция, пройденная мышью в лабиринте, непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, влияние фактора *Возраст* ($F_{(1,36)}=7,65$, $P=0,0090$); (Б) время замирания в открытых рукавах

непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, влияние фактора *Генотип* ($F_{(1,36)}=39,13$, $P<0,0001$). Данные представлены в виде $\text{Mean}\pm\text{S.E.M.}$

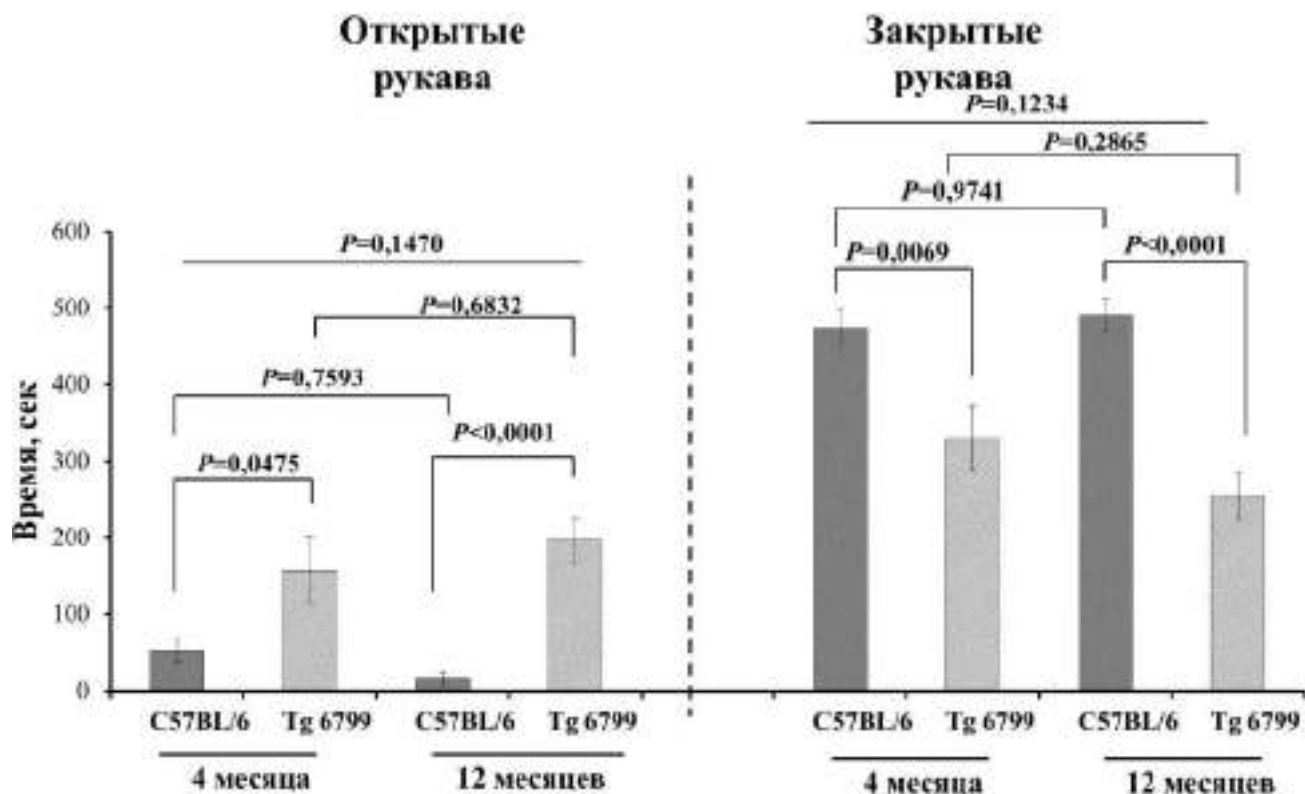


Рисунок 25 – Поведение животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 и 12 месяцев и животных контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 4 и 12 месяцев в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Время нахождения в открытых (непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений влияние фактора *Генотип* ($F_{(1,34)}=29,54$, $P<0,0001$)) и закрытых рукавах (непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений влияние фактора *Генотип* ($F_{(1,34)}=42,29$, $P<0,0001$)). Данные представлены в виде $\text{Mean}\pm\text{S.E.M.}$

Это обусловлено тем, что животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 месяцев статистически значимо ($P=0,0007$) больше времени ($87,00\pm 7,83$) замирали, находясь в открытых рукавах, по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) в аналогичном возрасте ($13,16\pm 2,16$). Подобное наблюдается у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) по мере развития заболевания (в возрасте 12 месяцев): время замирания в открытых рукавах ($90,09\pm 29,33$) значимо больше ($P=0,0003$) по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) ($11,04\pm 3,90$) (**рисунок 24 Б**). При этом важно отметить, что непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений показал отсутствие взаимного влияния *Генотип* \times *Возраст* ($F_{(1,36)}=0,05$, $P=0,8325$) и фактора *Возраст* ($F_{(1,36)}=0,01$, $P=0,9686$) на время замирания в открытых рукавах, тогда как фактор *Генотип* ($F_{(1,36)}=39,13$, $P<0,0001$) оказывает значимое влияние.

Таким образом, продолжительное время замирания как один из ключевых параметров в поведении, которое вызвано страхом, беспокойством, тревогой, может указывать на повышение уровня тревожности у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера по мере развития заболевания.

3.1.5 Результаты нейроповеденческого тестирования «Трехкамерный социальный тест»

«Трехкамерный социальный тест» использовали для изучения социальной памяти и социального взаимодействия у животных.

На первом этапе тестирования (фаза привыкания), когда в двух боковых камерах (левой и правой) находились несоциальные объекты (цилиндры), животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799, $n=10$)

в возрасте 4 месяцев и животные контрольной группы (линия C57BL/6, n=10) в возрасте 4 месяцев не проявляли значимого предпочтения по времени проведения в левой и правой камере (**рисунок 26**).

По мере прогрессирования заболевания (в возрасте 12 месяцев) животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) также не проявляли значимого предпочтения по времени нахождения в левой и правой камере (**рисунок 26**).

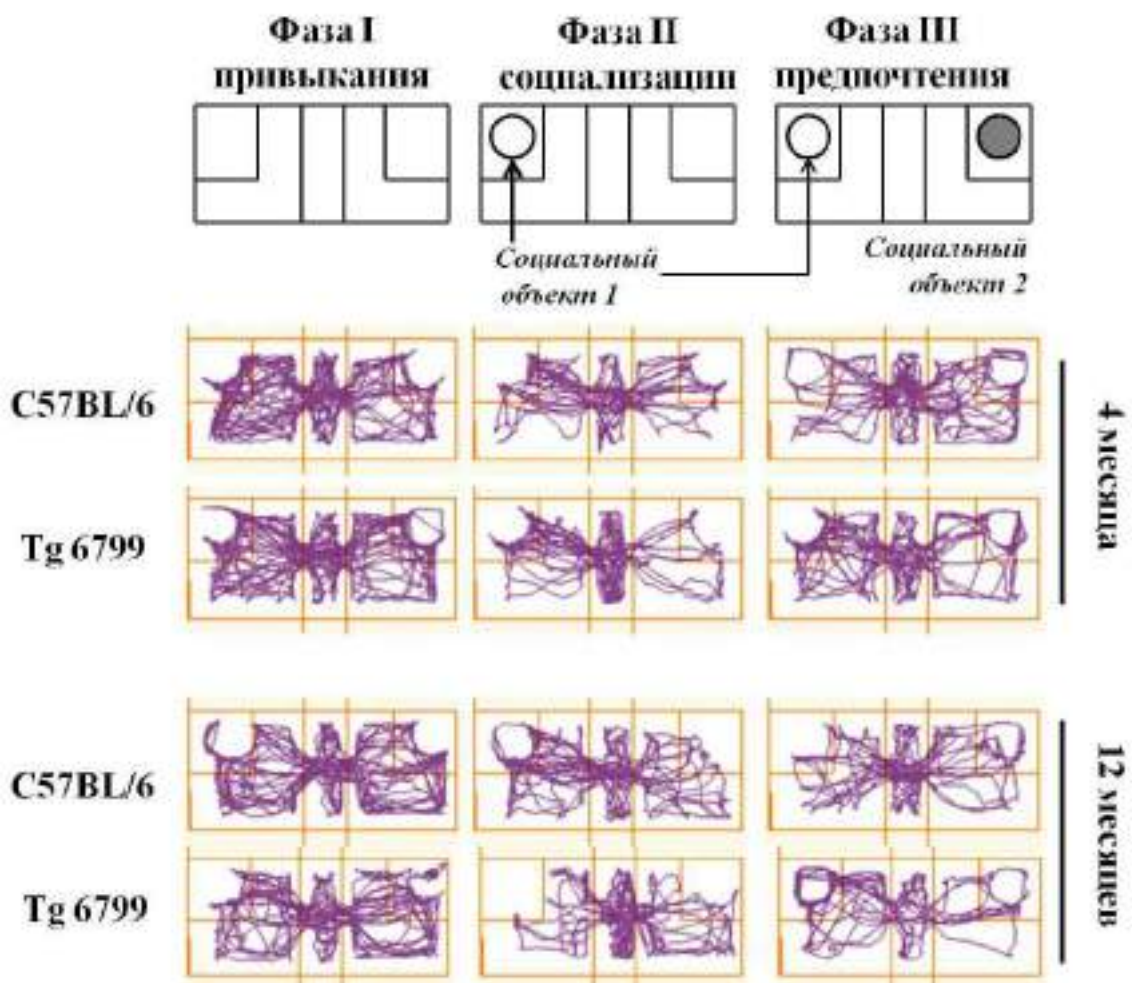


Рисунок 26 – Схема эксперимента и образцы треков в тесте «Трехкамерный социальный тест» животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) и животных контрольной группы (линия C57BL/6)

Социальный объект 1 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 месяцев) помещалась в левую камеру в фазе социализации; новый социальный объект 2 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 месяцев) помещалась в правую камеру в фазе предпочтения.

На втором этапе тестирования (фаза социализации), когда в левую камеру помещали социальный объект 1 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 месяцев, находящаяся в цилиндре), непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Sidak's тестом множественных сравнений выявил взаимное влияние *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,36)}=7,96$, $P=0,0077$) и фактора *Возраст* ($F_{(1,36)}=13,26$, $P=0,0008$) на число входов в левую камеру.

Так, количество входов в левую камеру с социальным объектом у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 месяцев ($31,10\pm 7,19$) значимо не отличалось ($P=0,1153$) от животных контрольной группы (линия C57BL/6) в аналогичном возрасте ($20,20\pm 1,23$). Стоит отметить, что по мере прогрессирования заболевания (в возрасте 12 месяцев) животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) значимо ($P=0,0003$) меньше заходили в левую камеру ($10,17\pm 2,56$), чем в возрасте 4 месяцев (**рисунок 27 А**).

На третьем этапе тестирования (фаза предпочтения), когда в правую камеру помещали новый социальный объект 2 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 месяцев, находящаяся в цилиндре), непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Sidak's тестом множественных сравнений не выявил взаимного влияния *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,36)}=1,42$, $P=0,2404$), но показал значимый вклад фактора *Генотип* ($F_{(1,36)}=32,59$, $P<0,0001$) на число входов в камеру с новым социальным объектом.

Как показали результаты исследований, животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 месяцев отдают предпочтение уже знакомому социальному объекту, о чем свидетельствует число входов к новому социальному объекту, которое значимо ($P=0,0148$)

меньше ($9,90 \pm 2,07$) по сравнению с животными контрольной группы в аналогичном возрасте ($18,60 \pm 2,05$). Подобная ситуация наблюдается и по мере развития заболевания (в возрасте 12 месяцев) (рисунок 27 Б).

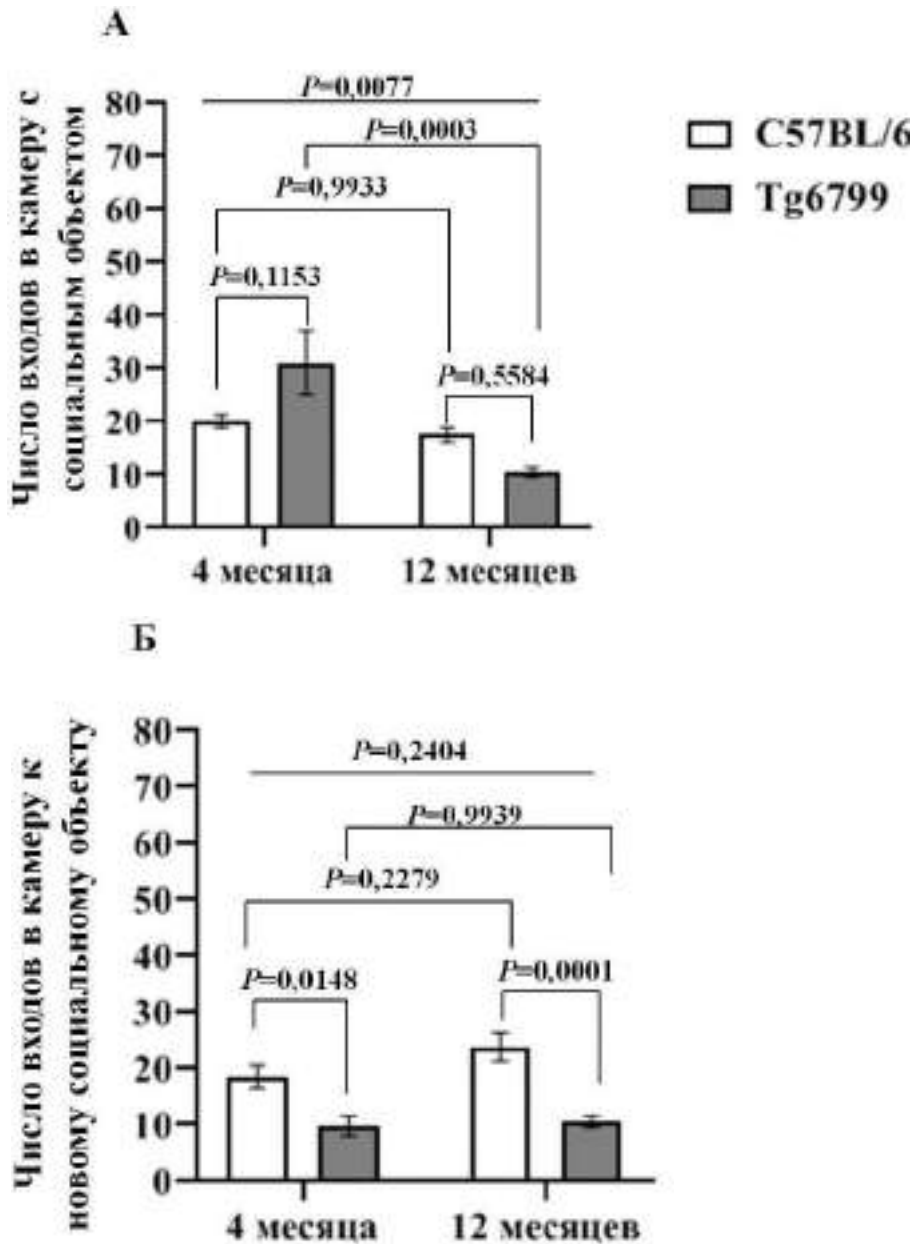


Рисунок 27 – Поведение животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в возрасте 4 и 12 месяцев и животных контрольной группы (линия C57BL/6) в возрасте 4 и 12 месяцев в тесте «Трехкамерный социальный тест»

(А) Число входов к социальному объекту в фазе социализации (непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с

последующим Sidak's тестом множественных сравнений выявил взаимное влияние *Генотип*×*Возраст* ($F_{(1,36)}=7,96$, $P=0,0077$) и фактора *Возраст* ($F_{(1,36)}=13,26$, $P=0,0008$); (Б) Число входов к новому социальному объекту (фаза предпочтения) (непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Sidak's тестом множественных сравнений фактор *Генотип* ($F_{(1,36)}=32,59$, $P<0,0001$). Данные представлены в виде $\text{Mean}\pm\text{S.E.M.}$

Таким образом, животные с генетической моделью болезни Альцгеймера демонстрировали социализацию, однако предпочитали взаимодействовать с уже знакомым нежели с новым социальным объектом, проявляя при этом повышенную тревожность. Это указывало на нарушение социальной памяти, и как следствие, на затруднение в распознавании нового социального объекта, проявляющееся при прогрессировании заболевания.

3.1.6 Результаты нейроповеденческого тестирования «Восьмирукавный радиальный лабиринт»

Долговременную пространственную память анализировали, используя подсчет количества корректных и некорректных входов в рукава на 3 этапе теста в фазе тестирования.

В первый день тестирования, после предварительной тренировки, животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799, $n=10$) в возрасте 4 месяцев показали средний балл памяти ($-0,65\pm 0,06$), который к четвертому дню тестирования статистически значимо не изменился ($P=0,8033$) и составил ($-0,62\pm 0,05$). Тогда как у животных контрольной группы (линия C57BL/6, $n=10$) в аналогичном возрасте средний балл памяти от первого ($-0,56\pm 0,04$) к четвертому ($-0,36\pm 0,06$) дню значимо ($P=0,0319$) увеличивался.

Важно отметить, что средний балл памяти у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера в четвертый день тестирования значимо ($P=0,0019$) меньше по сравнению с животными контрольной группы, что указывает на совершение животными с генетической моделью болезни Альцгеймера большего количества некорректных входов в рукава по сравнению с животными контрольной группы (**рисунок 28 А**).

При перерыве на пятый день тестирования у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера средний балл памяти от четвертого к шестому дню тестирования ($-0,62\pm 0,05$ и $-0,69\pm 0,04$, соответственно) значимо не изменился ($P=0,4029$). Противоположная ситуация наблюдается у животных контрольной группы, а именно, значимое ($P=0,0343$) уменьшение среднего балла памяти от четвертого к шестому дню тестирования ($-0,36\pm 0,06$ и $-0,58\pm 0,05$, соответственно) (**рисунок 28 А**).

С возрастом (в 12 месяцев) мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) в первый день тестирования, после предварительной тренировки, показали средний балл памяти ($-0,33\pm 0,08$), который к четвертому дню тестирования значимо не изменился ($P=0,8807$) и составил ($-0,35\pm 0,07$) (**рисунок 28 Б**). У животных контрольной группы (линия C57BL/6) наблюдалось увеличение среднего балла памяти от первого к четвертому дню тестирования без значимого различия показателя между первым и четвертым днем ($P=0,2713$) (**рисунок 28 Б**).

Перерыв на пятый день тестирования не оказал значимого влияния на средний балл памяти от четвертого к шестому дню тестирования ($-0,35\pm 0,07$ и $-0,32\pm 0,08$, соответственно) у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера ($P=0,8242$). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы ($P=0,9924$) (**рисунок 28 Б**).

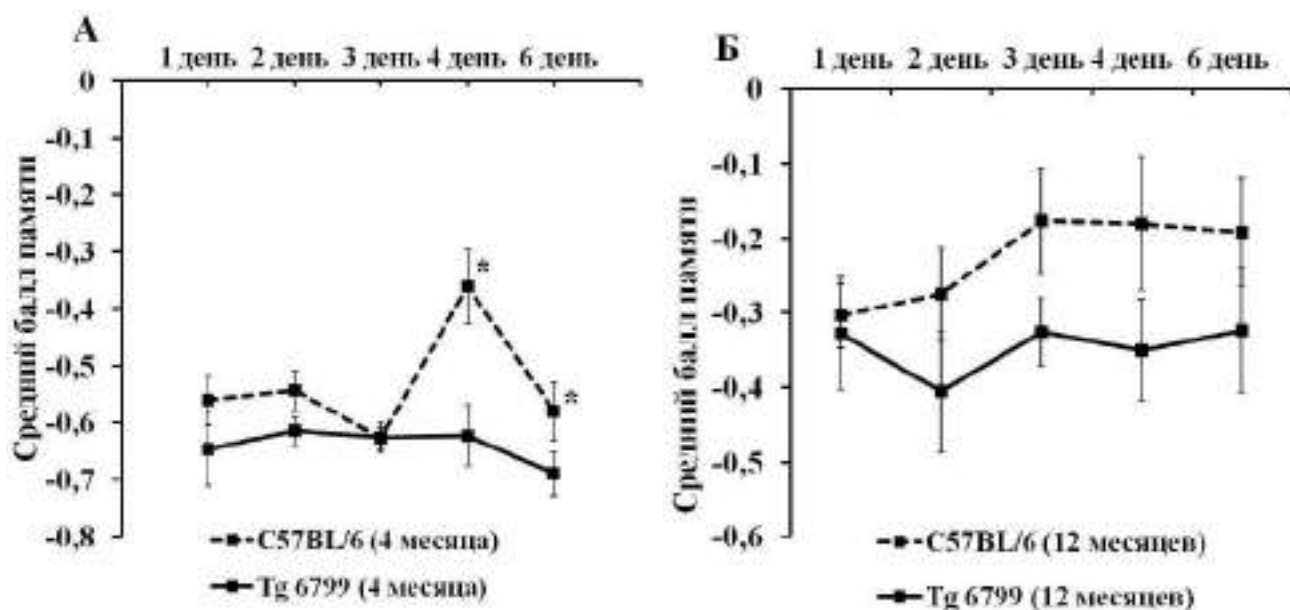


Рисунок 28 – Поведение животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) и животных контрольной группы (линия C57BL/6) в тесте «Восьмирукавный радиальный лабиринт»

(А) Средний балл памяти в возрасте 4 месяцев (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни); (Б) Средний балл памяти в возрасте 12 месяцев. Данные представлены в виде Mean±S.E.M., n=20.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера наблюдается нарушение пространственного обучения и долговременной памяти при прогрессировании нейродегенерации.

В целом, исходя из полученных нами данных, можно заключить, что нейродегенерация альцгеймеровского типа сопровождается развитием нарушений когнитивных функций, различных видов памяти, а также запоминания, сопряженного с эмоциональной окраской событий, за что в полной мере ответственны столь важные структуры головного мозга, как гиппокамп и миндалевидное тело, которые экспрессируют значительное количество молекул-компонентов инсулин-сигнального пути и демонстрируют

значимые атрофические нарушения при прогрессировании болезни Альцгеймера. В совокупности, это откладывает свой отпечаток на поведение, а именно, формируется тревожность и заторможенность, нарушаются процессы запоминания, пространственного, социального и ассоциативного обучения, а также способность к социальным взаимодействиям и образованию новых социальных контактов. Это может указывать о вовлеченности в патологический процесс гиппокампа и миндалевидного тела головного мозга – ключевых структур головного мозга, которые подвержены повреждающему действию бета-амилоида.

Результаты исследований по изучению особенностей реализации эмоций и когнитивных функций у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера опубликованы в статье «Поведенческий фенотипический анализ животных с генетической моделью болезни Альцгеймера»¹.

¹ Горина Я.В. [и др.]. Поведенческий фенотипический анализ животных с генетической моделью болезни Альцгеймера // Биомедицина. 2017. №3. С.47-59.

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

Потенциальные механизмы, которые связывают церебральную инсулинорезистентность с патогенезом болезни Альцгеймера, включают в себя патологические изменения в обработке белка-предшественника бета-амилоида, нарушения инсулин-сигнальной трансдукции, что, в конечном итоге, приводит к дисфункции нейронов и синапсов, нейровоспалению, апоптозу, окислительному стрессу и т.д. [401].

Как известно, механизм инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции через инсулиновые рецепторы (IR) реализуется по двум ключевым сигнальным путям: фосфатидилинозитол 3-киназному (PI3K/Akt-путь) и митоген-активируемому протеинкиназному (MAPK-путь) [181]. При этом каждый из указанных путей вносит свой существенный вклад в реализацию эффектов инсулина, а также структурно-функциональную деятельность нервных клеток [304, 868]. Поэтому было интересно изучить экспрессию молекул-компонентов инсулин-сигнальной трансдукции в миндалевидном теле в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Исследование уровня мРНК инсулина (insulin I), инсулина и лактата с использованием животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) продиктовано необходимостью оценки нарушения экспрессии инсулина и дисметаболизма глюкозы при «подостром» токсическом действии бета-амилоида.

3.2.1 Экспрессия мРНК инсулина в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

На сегодняшний день продолжаются научные дискуссии относительно синтеза инсулина в ЦНС. Так, исследования на животных моделях выявили присутствие мРНК инсулина в различных областях мозга [80, 644, 758]. В результате клинических исследований обнаружено присутствие С-пептида, секретируемого при синтезе инсулина в бета-клетках поджелудочной железы, в спинномозговой жидкости [98, 274].

В подтверждении выше изложенного, мы провели исследование уровня экспрессии мРНК инсулина (insulin I) в различных областях головного мозга животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS).

В результате проведенного эксперимента нами были количественно определены транскрипты мРНК, кодирующие insulin I, в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга исследуемых животных.

Выявлено, что уровень экспрессии гена insulin I (здесь и далее уровень представлен в у.е.) в гиппокампе животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера ($5,96 \pm 0,95$) статистически значимо ($P=0,0043$) выше по сравнению с ложно-оперированными животными ($1,27 \pm 0,23$) (**рисунок 29 А**). Аналогичная ситуация наблюдается и в миндалевидном теле головного мозга, а именно, уровень экспрессии гена insulin I при моделировании болезни Альцгеймера ($7,57 \pm 1,22$) статистически значимо больше ($P=0,0303$) по сравнению с группой ложно-оперированных животных ($2,83 \pm 0,41$) (**рисунок 29 Б**).

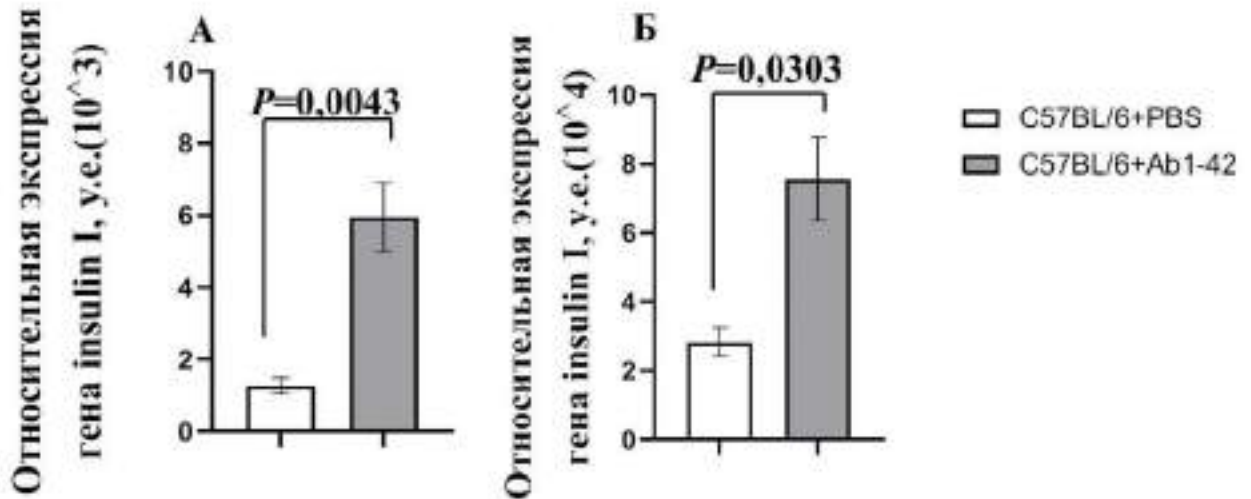


Рисунок 29 – Нарушение экспрессии мРНК инсулина в различных областях головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия мРНК insulin I у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS): (А) в гиппокампе (* $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); (Б) в миндалевидном теле (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean±S.E.M.

Полученные результаты убедительно показывают, что моделирование нейродегенерации альцгеймеровского типа путем интрагиппокампального введения бета-амилоида вызывает выраженное увеличение уровня экспрессии гена инсулина как в гиппокампе, так и миндалевидном теле головного мозга.

3.2.2 Уровень лактата и инсулина в различных регионах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

В настоящее время считается, что болезнь Альцгеймера сопровождается дисметаболизмом глюкозы различной степени тяжести в разных областях мозга [748]. Признаки aberrантного метаболизма глюкозы, такие как снижение поглощения ее клетками ЦНС, а также угнетение функций митохондрий, начинаются за несколько десятилетий до появления каких-либо симптомов или гистопатологических изменений [143, 183].

Мы исследовали концентрацию продукта метаболизма глюкозы – лактата в гиппокампе, миндалевидном теле и ольфакторной луковице головного мозга животных методом иммуноферментного анализа. Так, мы определили базальный уровень лактата у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS). Выявлено, что при моделировании болезни Альцгеймера происходит статистически значимое ($P=0,0276$) повышение уровня лактата в гиппокампе по сравнению с ложно-оперированными животными (**рисунок 30**). Однако 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 30**). При этом установлено взаимное влияние *интрагиппокампальная инъекция* × *область головного мозга* ($F_{(2,37)}=4,56$, $P=0,0169$) и фактора *область головного мозга* ($F_{(2,37)}=3,319$, $P=0,0472$).

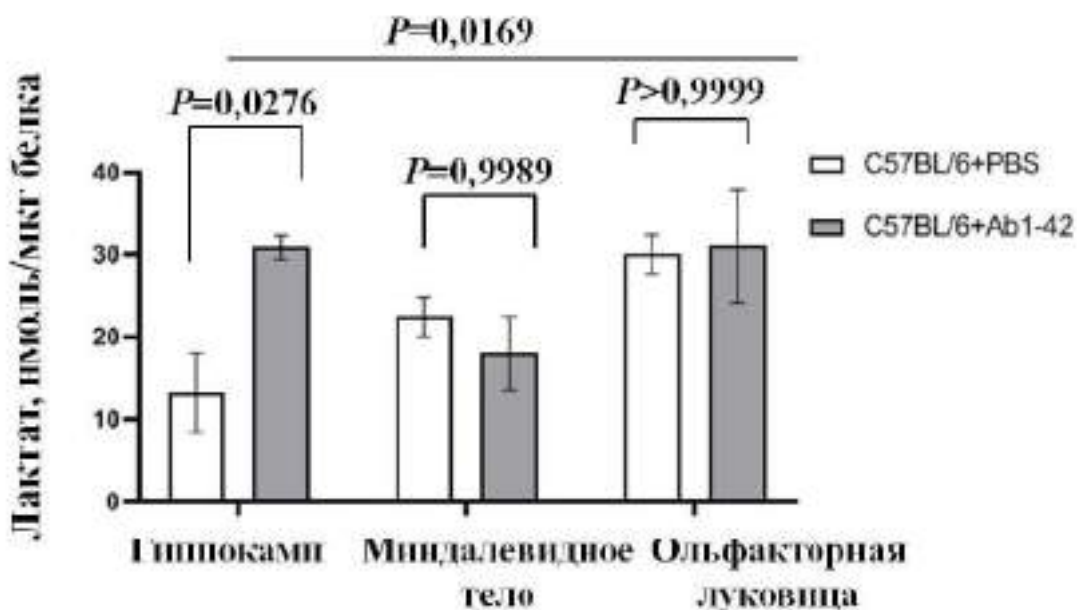


Рисунок 30 – Изменение уровня лактата в различных регионах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Уровень лактата у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) в гиппокампе, миндалевидном теле и ольфакторной луковице головного мозга. Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Sidak's тестом множественных сравнений взаимное влияние *интрагиппокампальная инъекция* × *область головного мозга* ($F_{(2,37)}=4,56$, $P=0,0169$) и фактора *область головного мозга* ($F_{(2,37)}=3,319$, $P=0,0472$). Данные представлены в виде Mean±S.E.M.

До недавнего времени церебральный метаболизм глюкозы в основном считался инсулиннезависимым процессом. Тем не менее, недавние исследования выявили важную роль инсулина в церебральном / периферическом метаболизме глюкозы [430, 780].

Результаты одного из исследований показывают [96] увеличение церебрального метаболизма глюкозы после восстановления базальных уровней инсулина у метаболически здоровых пациентов, при этом данные

метаболические изменения были наиболее заметны в областях коры. Это указывает на то, что нормальные базальные уровни периферического инсулина могут играть важную роль в поддержании церебрального метаболизма глюкозы.

Поэтому логичным продолжением следует измерение уровня инсулина в различных отделах головного мозга животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) при «подостром» токсическом действии бета-амилоида.

При определении уровня инсулина выявлено значимое взаимное влияние *интрагиппокампальная инъекция* × *область головного мозга* ($F_{(2,37)}=4,56$, $P=0,0169$), при этом у животных с интрагиппокампальным введением бета-амилоида (C57BL/6+Ab1-42) наблюдается большее увеличение уровня инсулина в миндалевидном теле головного мозга по сравнению с ложнооперированными животными (C57BL/6+PBS), однако эта разница не была статистически значимой ($P=0,1387$). В гиппокампе и ольфакторной луковице различий не наблюдалось (рисунок 31).

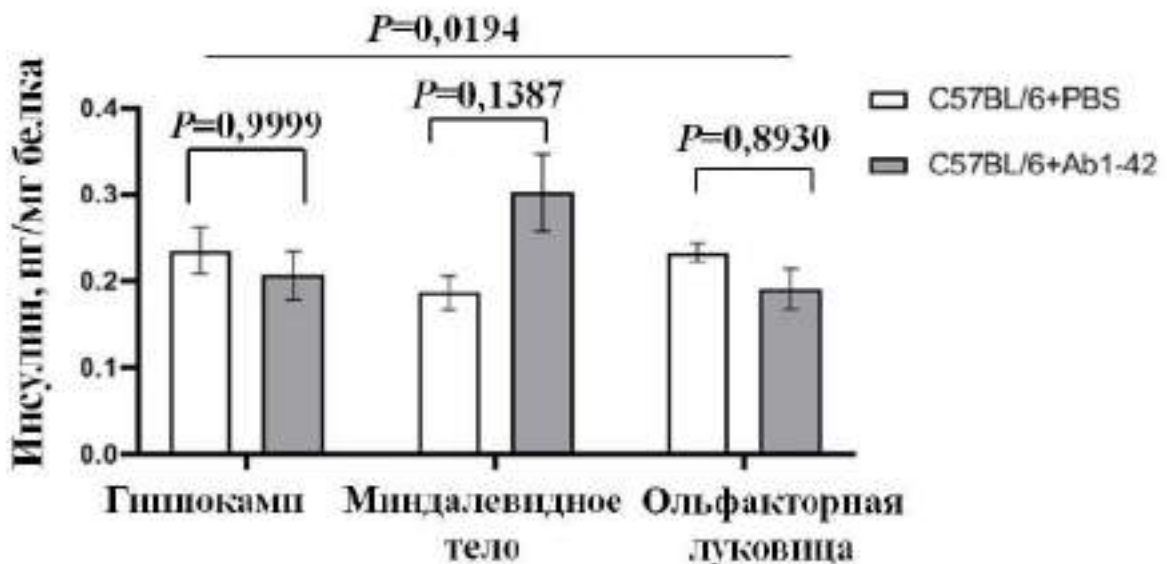


Рисунок 31 – Изменение уровня инсулина в различных регионах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Уровень инсулина у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) в гиппокампе, миндалевидном теле и ольфакторной луковице головного мозга. Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Sidak's тестом множественных сравнений взаимное влияние фактора *интрагиппокампальная инъекция* × *область головного мозга* ($F_{(2,30)}=4,51$, $P=0,0194$). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$

Полученные данные показывают, что нейродегенерация альцгеймеровского типа (в условиях «подострого» нейротоксического действия бета-амилоида) сопровождается повышением базального уровня лактата в гиппокампе, что в свою очередь сопряжено с тенденцией повышения уровня инсулина в миндалевидном теле и значимом влиянии фактора *интрагиппокампальная инъекция* × *область головного мозга* на уровень инсулина в ткани головного мозга.

3.2.3 Экспрессия IR и IRS1 в нейронах гиппокампа головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Как известно, инсулиновые рецепторы локализируются в определенных отделах головного мозга, а именно в коре, гиппокампе, гипоталамусе, обонятельной луковице, миндалевидном и полосатом теле. Столь избирательное распределение инсулиновых рецепторов (IR) показывает, что инсулин, связываясь с IR, инициирует передачу сигналов нейронов в различных областях мозга [866]. Кроме того, региональная локализация IR в гиппокампе

[815] предполагает, что инсулин может влиять на память – одну из основных задач, поддерживаемых гиппокампом и тесно связанными структурами.

Использование инъекционной моделью болезни Альцгеймера продиктовано необходимостью оценка уровня экспрессии IR и IRS1 в нейронах гиппокампа головного мозга при «подостром» токсическом действии амилоида.

Изучая уровень экспрессии IRS1 у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42), мы выявили статистически значимое снижение экспрессии IRS1 в зрелых гранулярных нейронах гиппокампа головного мозга ($4,95 \pm 0,51$) по сравнению с ложно-оперированными животными (C57BL/6+PBS) ($12,75 \pm 2,05$) ($P=0,0070$) (рисунок 32 А).

На этом фоне нами выявлено и значимое ($P=0,0089$) уменьшение уровня экспрессии IR в гиппокампе головного мозга животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) ($9,77 \pm 0,88$) по сравнению с ложно-оперированными животными (C57BL/6+PBS) ($15,77 \pm 1,27$) (рисунок 32 Б).

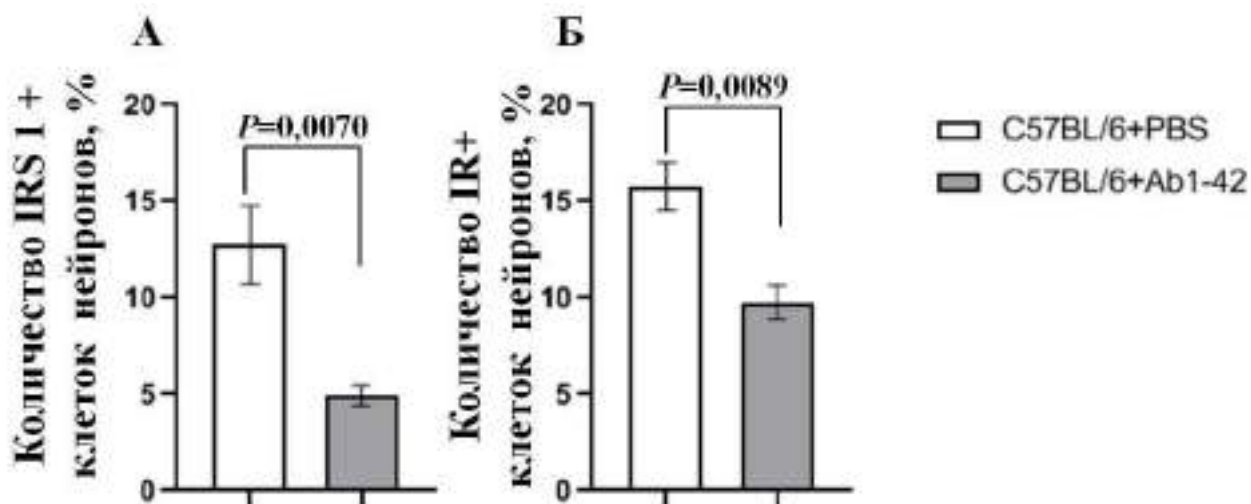


Рисунок 32 – Нарушение экспрессии молекул-маркеров инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера

(А) Экспрессия IRS1 на клетках нейрональной природы в гиппокампе головного мозга; (Б) Экспрессия IR на клетках нейрональной природы в гиппокампе головного мозга животных с инъекционной моделью болезни

Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) (* $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

В целом, обнаруженное нами снижение экспрессии IRS1 и IR в гиппокампе животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера подтверждает развитие локальной инсулинорезистентности в условиях «подострого» токсического действия бета-амилоида.

Результаты исследований по изучению уровня мРНК insulin I, уровня инсулина и лактата опубликованы в статье «Особенности экспрессии гена инсулина и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-сигнального пути при болезни Альцгеймера»².

3.2.4 Экспрессия маркера инсулинорезистентности – инсулинрегулируемой аминопептидазы (IRAP) на клетках нейрональной и глиальной природы, и совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером (GLUT4)

Как известно, болезнь Альцгеймера сопровождается прогрессирующей потерей памяти и нарушением когнитивных функций, поэтому актуальным является детальное изучение новых потенциальных молекул-мишеней, в частности, инсулинрегулируемой аминопептидазы (IRAP), которая может

² Горина Я.В. [и др.]. Особенности экспрессии гена инсулина и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-сигнального пути при болезни Альцгеймера // Фундаментальная и клиническая медицина. 2021. №4(6). С. 8-21.

быть вовлечена в развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированную с инсулинорезистентностью [843].

Распределение IRAP в определенных областях головного мозга дает ценную информацию о его физиологической роли, а именно, его высокие концентрации в префронтальной и энторинальной коре, гиппокампе, переднем мозге и миндалевидном теле – областях, участвующих в реализации когнитивных функций [238]. Несмотря на установленные факты того, что ингибиторы IRAP улучшают как кратковременную, так и долговременную память, а также оказывают положительное влияние на обучение, физиологическая функция IRAP в головном мозге остается не до конца ясной [39].

Каким образом экспрессируется IRAP на нейронах и астроцитах в миндалевидном теле – области головного мозга, тесно связанной с реализацией эмоциональной памяти, как в условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида (у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера – CD1+A β 1-42), так и при прогрессировании хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа (у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера)?

В ходе исследования экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы в миндалевидном теле головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера было определено количество нейронов и астроцитов, которые экспрессировали IRAP.

Так, у животных после моделирования болезни Альцгеймера путем интрагиппокампального введения бета-амилоида (CD1+A β 1-42) выявлено значимое снижение ($P=0,0079$) экспрессии IRAP зрелыми гранулярными нейронами в миндалевидном теле головного мозга ($10,57\pm 1,17$) по сравнению с ложно-оперированными животными (CD1+PBS) ($20,46\pm 1,48$) (**рисунок 33 А, рисунок 34А-Б**). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799): значимое снижение экспрессии IRAP в зрелых гранулярных нейронах в миндаине

(12,43±2,07) по сравнению с контрольной группой (линия C57BL/6) (28,50±1,40) ($P=0,0074$) (рисунок 33 Б, рисунок 34 В-Г).

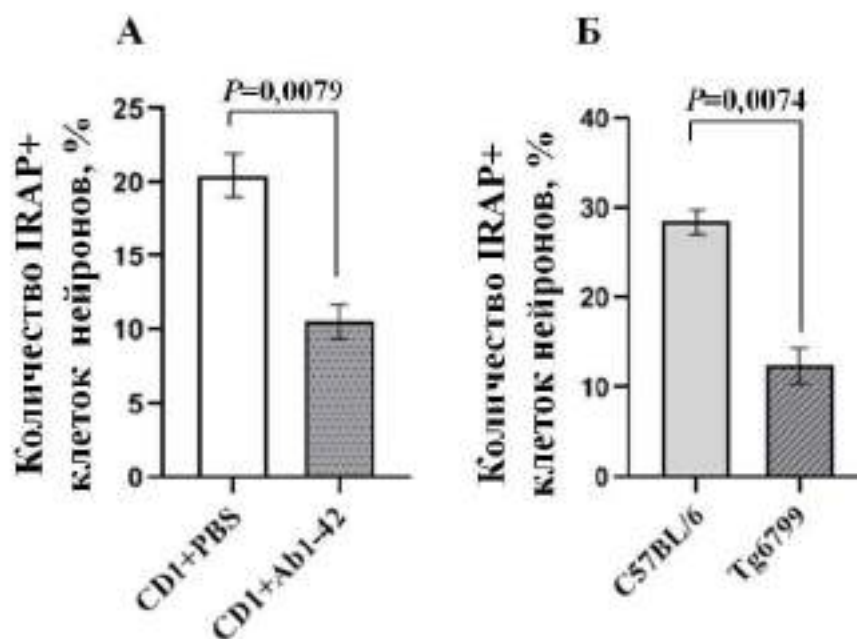


Рисунок 33 – Нарушение экспрессии IRAP на клетках нейрональной природы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия IRAP в миндалевидном теле головного мозга: (А) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (CD1+PBS) ($*P<0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); (Б) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) ($*P<0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean±S.E.M. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

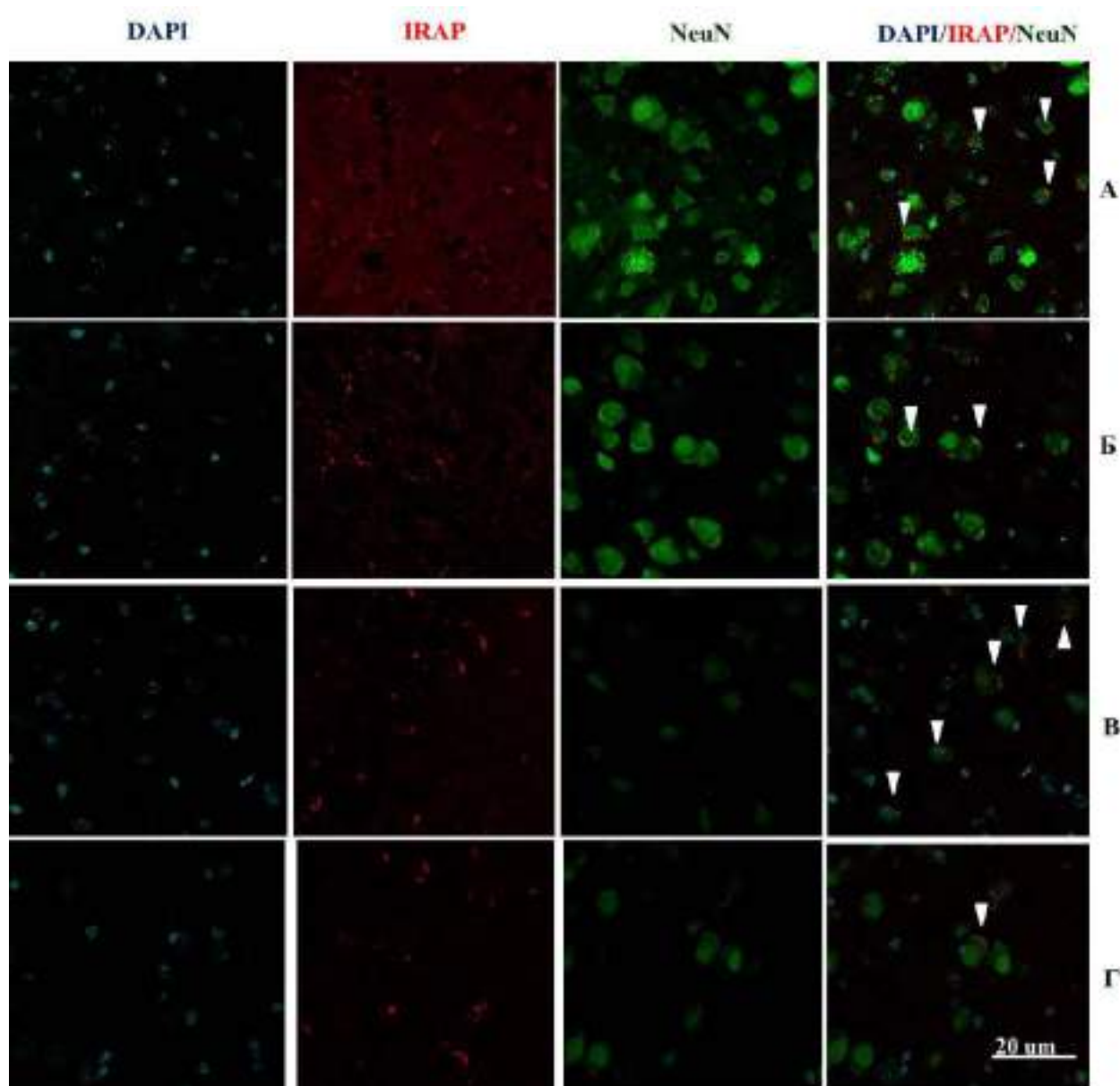


Рисунок 34 – Иммуногистохимический анализ экспрессии IRAP на клетках нейрональной природы в миндалевидном теле головного мозга животных разных экспериментальных групп

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия IRAP+клеток (красный), NeuN+клеток (зеленый), DAPI-ядра (голубой) в миндалевидном теле головного мозга в экспериментальных группах: (А) ложно-оперированные животные (CD1+PBS), (Б) животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab1-42), (В) контрольная группа (линия C57BL/6), (Г)

животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799). Стрелками обозначены клетки, несущие целевую метку.

Было обнаружено, что моделирование нейродегенерации путем интрагиппокампального введения бета-амилоида (мыши линии CD1+Ab1-42) вызывает значимое ($P=0,0080$) снижение ($6,33\pm 0,90$) экспрессии IRAP астроцитами в миндалевидном теле головного мозга по сравнению с ложнооперированными животными ($17,39\pm 1,85$) (рисунок 35 А, рисунок 36 А-Б). При этом у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) выявлено большее снижение ($7,92\pm 0,67$) экспрессии IRAP астроцитами в миндалевидном теле головного мозга по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) ($12,72\pm 1,77$), однако разница не была статистически значимой ($P=0,0635$) (рисунок 35 Б, рисунок 36 В-Г).

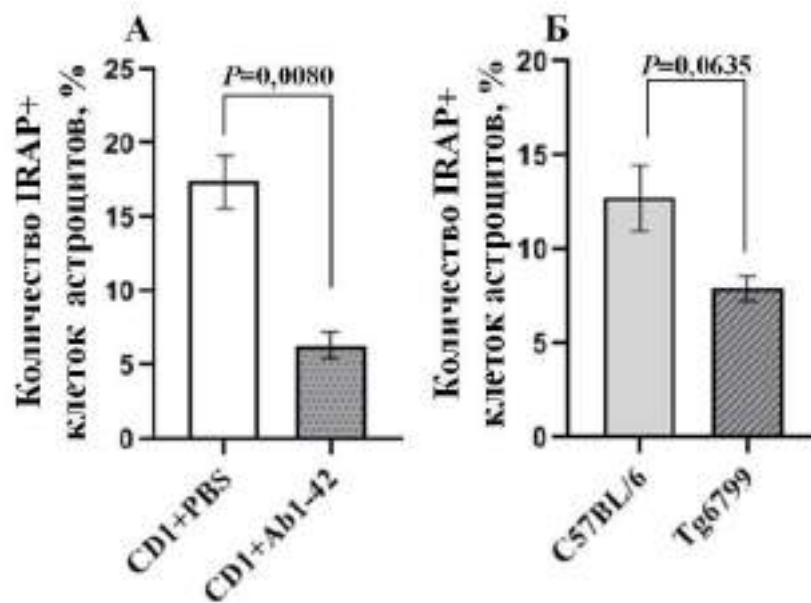


Рисунок 35 – Нарушение экспрессии IRAP на клетках астроглиальной природы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия IRAP в миндалевидном теле головного мозга: (А) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab1-42) и ложнооперированных животных (CD1+PBS) ($*P<0,05$ – сравнение с ложнооперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); (Б) у животных с

генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

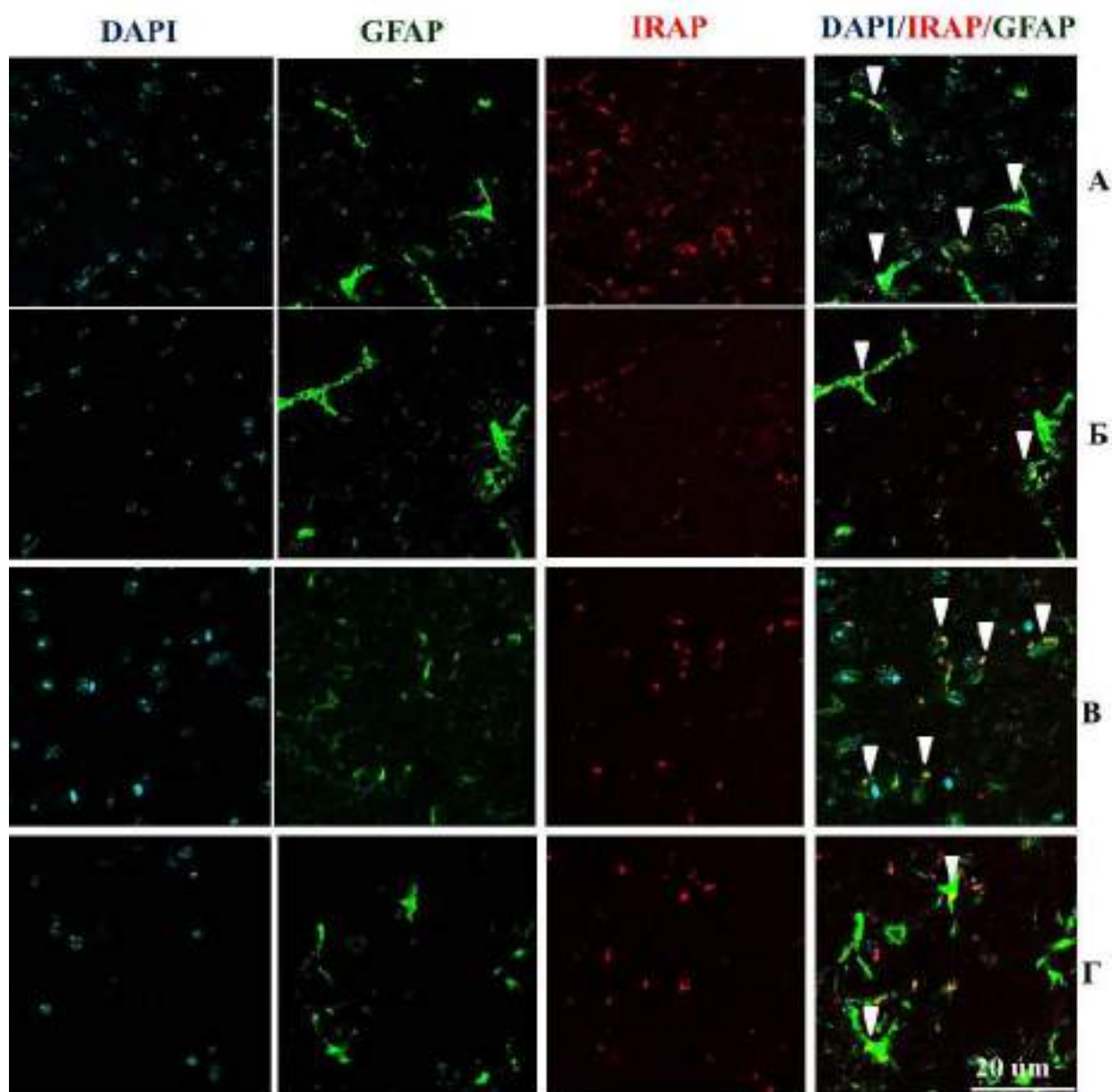


Рисунок 36 – Иммуногистохимический анализ экспрессии IRAP на клетках астроглиальной природы в миндалевидном теле головного мозга животных разных экспериментальных групп

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия IRAP+клеток (красный), GFAP+клеток (зеленый), DAPI-ядра (голубой) в миндалевидном теле головного мозга в экспериментальных группах: **(А)** ложно-оперированные животные (CD1+PBS), **(Б)** животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab1-42), **(В)** контрольная группа (линия C57BL/6), **(Г)** животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799). Стрелками обозначены клетки, несущие целевую метку.

Далее нам стало интересно выяснить меняется ли уровень IRAP в совместной локализации с GLUT4 в миндалевидном теле головного мозга животных в условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида (у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера – CD1+Aβ1-42) , так и при прогрессировании хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа (у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера).

Известно, что IRAP колокализован в специализированных везикулах с GLUT4, регулируя его внутриклеточный транспорт [239]. В свою очередь, везикулы реагируют на стимуляцию рецептора инсулина, перемещаясь к плазматической мембране для облегчения захвата глюкозы нервными клетками. Предполагается, что IRAP играет существенную роль в транслокации GLUT4 к мембране клетки [845], поэтому ингибирование экспрессии IRAP может привести к снижению экспрессии GLUT4 [389], тем самым снижая захват глюкозы нейронами, что в конечном итоге может негативно сказаться на формировании памяти.

В ходе исследования мы наблюдали у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Aβ1-42) низкий уровень ($8,99 \pm 1,38$) экспрессии IRAP совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером (GLUT4) в миндалевидном теле головного мозга по сравнению с ложно-оперированными животными (CD1+PBS) ($17,33 \pm 2,16$) при $P=0,0159$ (**рисунок 37 А, рисунок 38 А-Б**). При этом у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) выявлена большее ($P=0,0952$) снижение уровня

экспрессии IRAP совместно с GLUT4 ($14,23 \pm 0,90$) при сравнении с животными контрольной группы (линия C57BL/6) ($20,61 \pm 2,28$), однако разница не была статистически значимой ($P=0,0952$) (рисунок 37 Б, рисунок 38 В-Г).

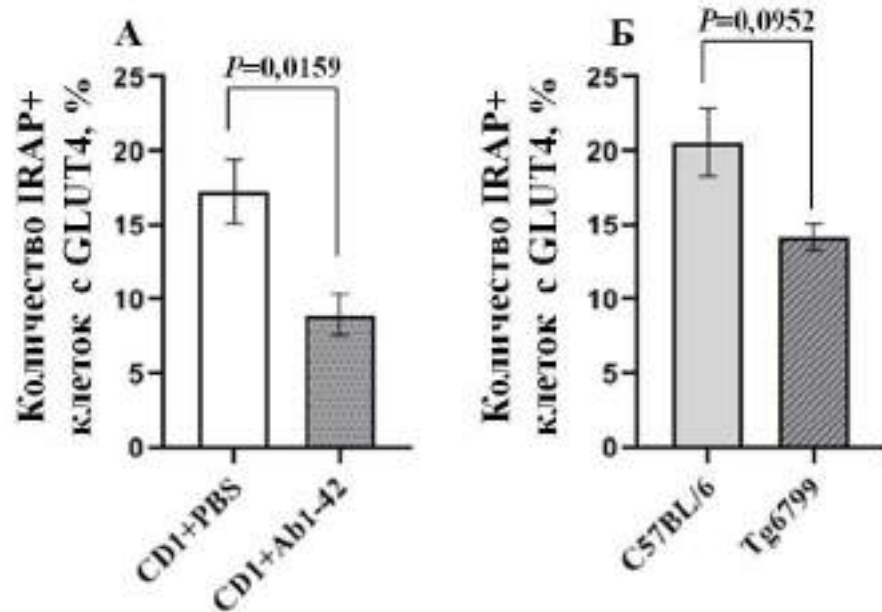


Рисунок 37 – Нарушение экспрессии IRAP совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером GLUT4 при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия IRAP в миндалевидном теле головного мозга: (А) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (CD1+PBS) ($*P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); (Б) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) ($*P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

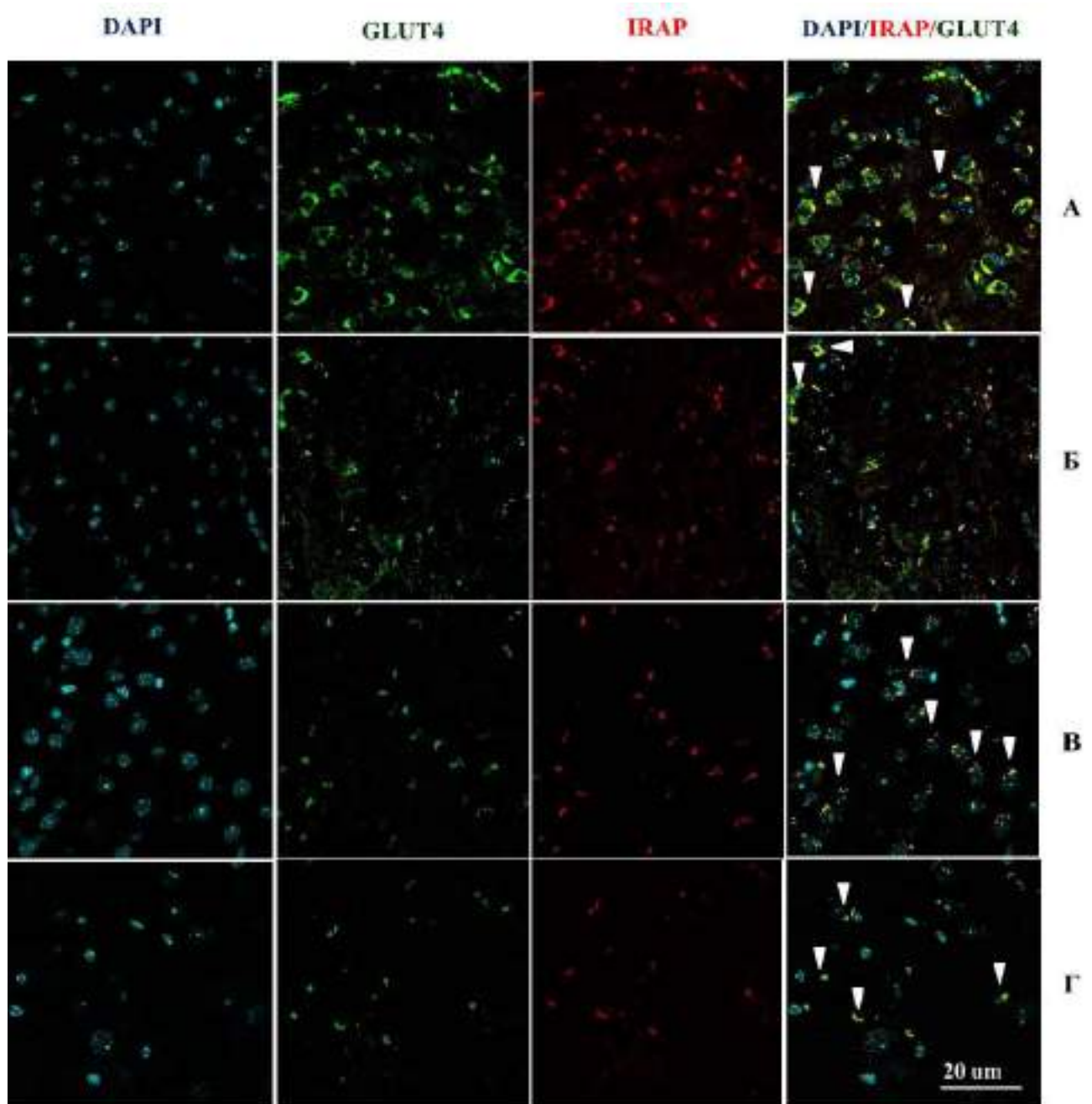


Рисунок 38 – Иммуногистохимический анализ экспрессии IRAP совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером GLUT4 в миндалевидном теле головного мозга животных разных экспериментальных групп

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 (CD1+PBS), (Б) животные с инъекционной моделью болезни

Альцгеймера (CD1+Ab1-42), **(В)** контрольная группа (линия C57BL/6), **(Г)** животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799). Стрелками обозначены клетки, несущие целевую метку.

Таким образом, мы установили, что развитие нейродегенерации сопровождается снижением интенсивности экспрессии IRAP в клетках как нейрональной, так и глиальной природы в миндалевидном теле головного мозга, что также ассоциировано с уменьшением уровня экспрессии IRAP совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером GLUT4.

Результаты исследований по изучению экспрессии IRAP на клетках нейрональной и астроглиальной природы, а также совместно с инсулинозависимым глюкозным транспортером GLUT4 опубликованы в статье «Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера»³

3.2.5 Оценка трансмембранного потенциала митохондрий головного мозга животных в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

Многоуровневый анализ и значительное количество проведенных экспериментальных исследований, которые варьируются от геномного анализа на животных моделях до клеточных модельных систем *in vitro* и визуализации головного мозга человека, демонстрируют, что дисфункция метаболизма глюкозы, нарушение биоэнергетики и митохондриальной функции являются последовательными предпосылками для развития болезни Альцгеймера [357, 719, 839]. Абerrантный метаболизм глюкозы в головном мозге и дисфункция

³ Горина Я.В. [и др.]. Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // Бюллетень сибирской медицины = Bulletin of Siberian Medicine = Byulleten Sibirskoy Meditsiny. 2017. №6. С.1-5.

митохондрий может проявляться за десятилетия до появления гистопатологических и / или клинических признаков и, таким образом, может служить биомаркером развития болезни Альцгеймера, а также терапевтической мишенью. Так, согласно многочисленным клиническим исследованиям, снижение церебрального метаболизма глюкозы, наблюдаемое при развитии болезни Альцгеймера и легких когнитивных нарушениях, коррелирует с нарушениями гликолитического пути и работы цикла трикарбоновых кислот, а также патологическими изменениями активности ряда нейромедиаторов, таких как глутамат, глутамин, γ -аминомасляная кислота (ГАМК) и N- ацетиласпартат [215, 319, 673].

Известно, что около 90% глюкозы, поступающей в головной мозг, окисляется до CO_2 , в основном за счет митохондриального метаболизма, при этом большая часть этой энергии используется для поддержания нейротрансмиссии и нейронального потенциала, а также для предотвращения эксайтотоксичности [508]. Таким образом, дисметаболизм глюкозы может оказывать негативное влияние на функционировании цикла трикарбоновых кислот в митохондриях, что в свою очередь приводит к прогрессированию aberrантного энергетического метаболизма, что, в конечном итоге, отражается на познании, обучении и памяти.

В этой связи мы изучили трансмембранный потенциал митохондрий в норме и его изменение в условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида (у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера – C57BL/6+A β 1-42).

Для этого нами было оценено поглощение JC-1 митохондриями в гиппокампе головного мозга экспериментальных животных. JC-1 – это липофильный положительно заряженный краситель, способный проникать и накапливаться внутри митохондрий, формируя комплексы – J-агрегаты. В отличие от других митохондриальных зондов, накопление JC-1 в клетках не зависит от потенциала плазматической мембраны и определяется исключительно митохондриальным трансмембранным потенциалом. Более

того, такие факторы, как размер, форма и плотность митохондрий в клетках, не влияют на определяемый параметр флуоресценции. Снижение трансмембранного митохондриального потенциала уменьшает содержание этого флуорофора в клетках, что регистрируется при гипоксии, апоптозе, повреждении клеток.

Нами выявлено значимое ($P=0,0020$) увеличение коэффициента поглощения JC-1 митохондриями у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера ($0,32\pm 0,004$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($0,21\pm 0,005$) (рисунок 39).

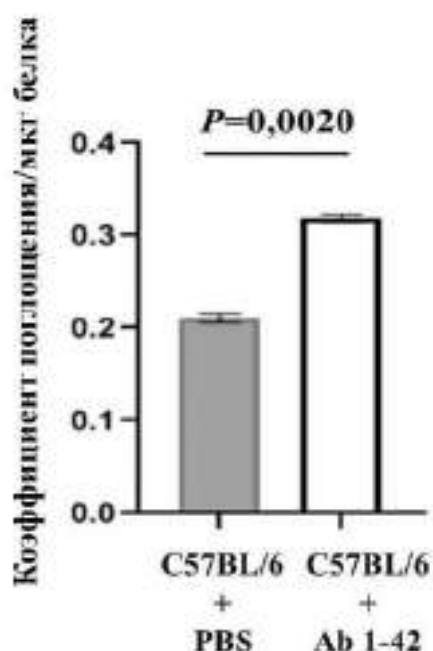


Рисунок 39 – Нарушение трансмембранного потенциала митохондрий при экспериментальной болезни Альцгеймера

Мембранный потенциал митохондрий в гиппокампе головного мозга животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) ($*P<0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean±S.E.M.

Таким образом, мы установили, что развитие нейродегенерации (в условиях острого токсического действия бета-амилоида) сопровождается

увеличением аккумуляции JC-1 в митохондриях клеток гиппокампа, что может быть следствием локального дисметаболизма глюкозы, выявленного нами ранее.

Результаты исследований по изучению трансмембранного потенциала митохондрий в гиппокампе при экспериментальной болезни Альцгеймера опубликованы в статье «Активность митохондрий в диализате у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера»⁴

3.2.6 Экспрессия молекул - компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Как мы установили ранее, развитие экспериментальной болезни Альцгеймера (в условиях «подострого» токсического действия бета-амилоида) сопровождается снижением экспрессии субстрата инсулинового рецептора 1(IRS1) и IR в гиппокампе головного мозга, поэтому логично было предположить, что аналогичные проявления формирования локальной инсулинорезистентности при развитии нейродегенерации будут характерны и для миндалевидного тела.

Кроме того, это послужило основанием детально изучить экспрессию ключевых молекул-компонентов инсулин-сигнального пути, таких как митоген-активированной протеинкиназы (MAPK), протеинкиназы С (PKC), гликогенсинтазы киназы-3-бета (GSK-3beta) и субстрата инсулинового рецептора 1(IRS1) на клетках нейрональной природы в миндалевидном теле головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера как в

⁴ Горина Я.В. [и др.]. Активность митохондрий в диализате у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера // Журнал эволюционной биохимии и физиологии = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2020. №7 (56). С.567.

условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида (у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера), так и при прогрессировании хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа (у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера).

Так, результаты исследования экспрессии митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) на клетках нейрональной природы показали значимое снижение ($P=0,0079$) уровня данного маркера после моделирования болезни Альцгеймера путем инъекционного введения бета-амилоида (CD1+Ab1-42) ($5,37\pm 0,58$) по сравнению с ложно-оперированными животными (CD1+PBS) ($14,11\pm 1,05$) (рисунок 40 А, рисунок 41 А-Б). Также было обнаружено, что при генетической модели болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) значимо ($P=0,0080$) снижалась экспрессия МАРК ($5,09\pm 0,60$) зрелыми гранулярными нейронами в миндалевидном теле головного мозга по сравнению с контрольной группой (линия C57BL/6) ($11,95\pm 1,66$) (рисунок 40 Б, рисунок 41 В-Г).

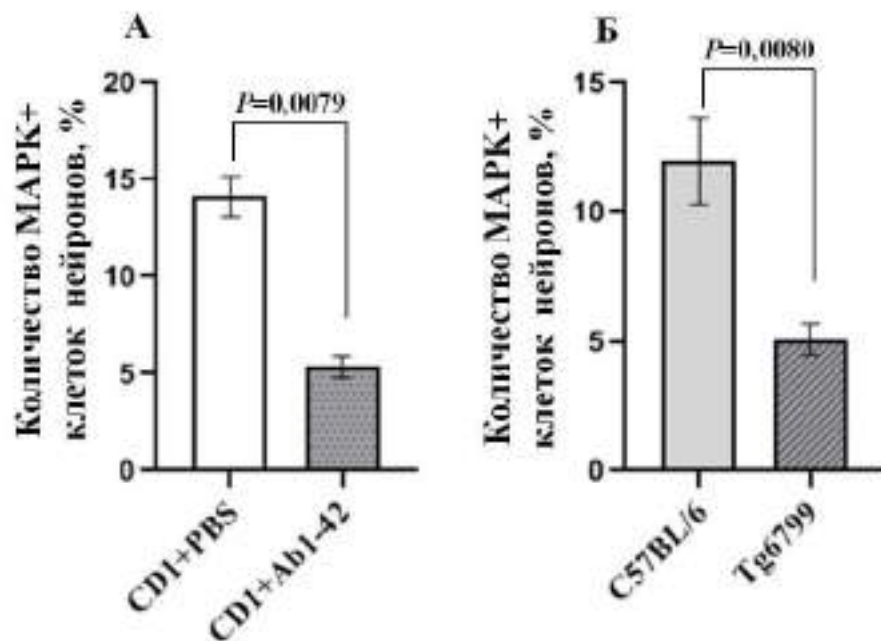


Рисунок 40 – Нарушение экспрессии МАРК на клетках нейрональной природы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия MAPK в миндалевидном теле головного мозга: **(А)** у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (CD1+PBS) (* $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); **(Б)** у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

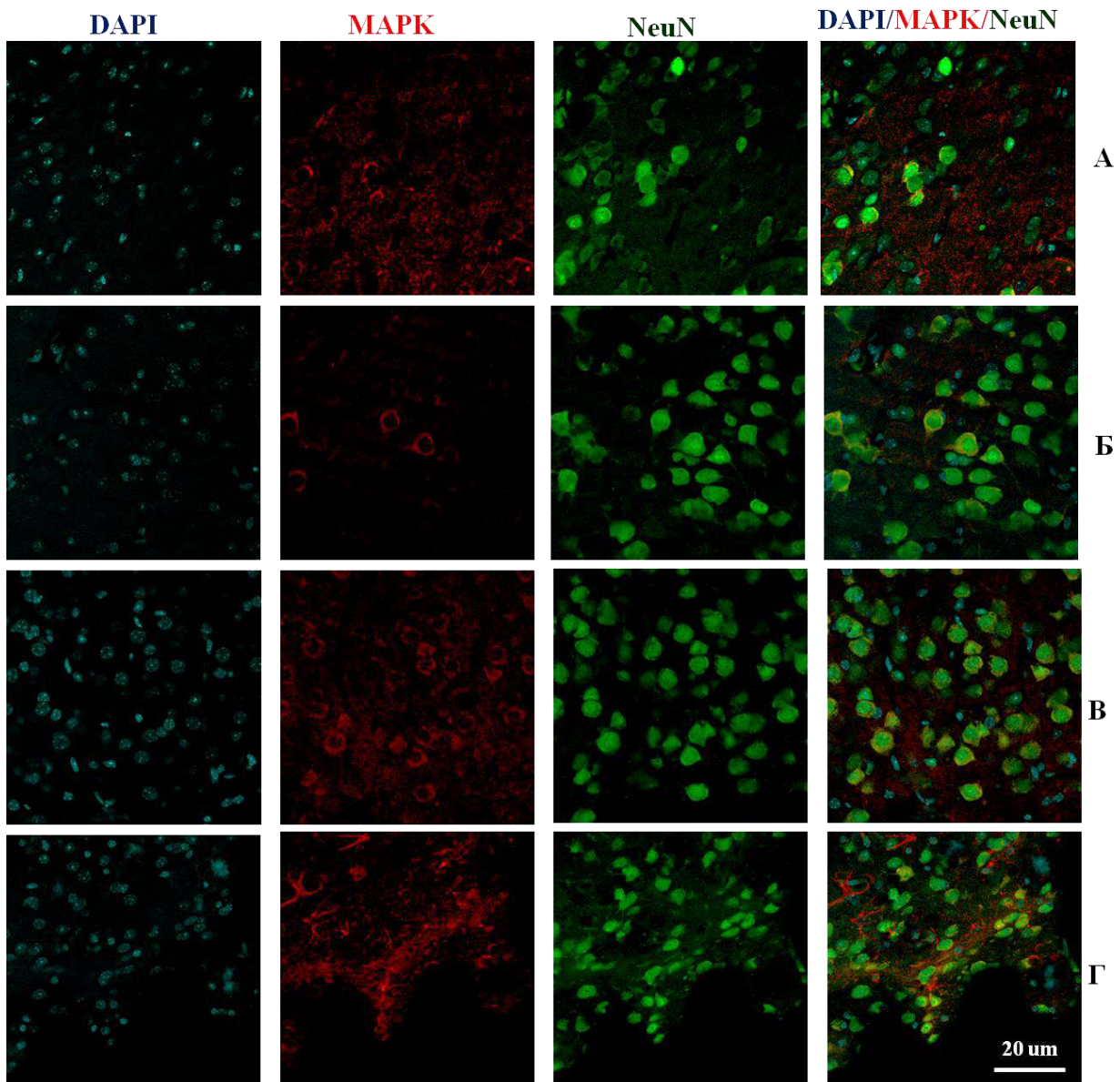


Рисунок 41 – Иммуногистохимический анализ экспрессии МАРК на клетках нейрональной природы в миндалевидном теле головного мозга животных разных экспериментальных групп

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия МАРК+клеток (красный), NeuN+клеток (зеленый), DAPI-ядра (голубой) в миндалевидном теле головного мозга в экспериментальных группах: **(А)** ложно-оперированные животные (CD1+PBS), **(Б)** животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (CD1+Ab1-42), **(В)** контрольная группа (линия C57BL/6), **(Г)** животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799).

Мы обнаружили значимое ($P=0,0159$) уменьшение экспрессии РКС нейронами в миндалевидном теле головного мозга при моделировании болезни Альцгеймера путем интрагиппокампального введения бета-амилоида (C57BL/6+Ab1-42) по сравнению с ложно-оперированными животными (C57BL/6+PBS) (**рисунок 42 А**). При этом у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799) было выявлено большее снижение экспрессии РКС нейронами в миндалевидном теле головного мозга по сравнению с контрольной группой (линия C57BL/6), однако разница не была статистически значимой ($P=0,0954$) (**рисунок 42 Б**).

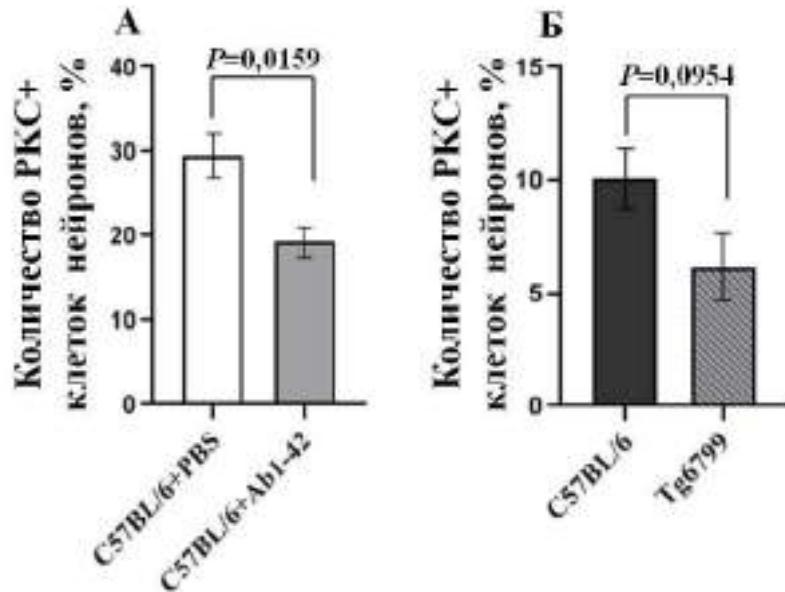


Рисунок 42 – Нарушение экспрессии РСК на клетках нейрональной природы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия РСК в миндалевидном теле головного мозга: **(А)** у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) (* $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); **(Б)** у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean±S.E.M. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

При исследовании экспрессии GSK-3beta в зрелых гранулярных нейронах миндалевидного тела головного мозга нами выявлено значимое различие ($P = 0,0079$) между животными с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированными (C57BL/6+PBS) (**рисунок 43 А**). Также наблюдали выраженное увеличение ($P = 0,0059$) экспрессии GSK-3beta и у животных с генетической моделью болезни

Альцгеймера (линия Tg6799) по сравнению с контрольной группой (C57BL/6) (рисунок 43 Б).

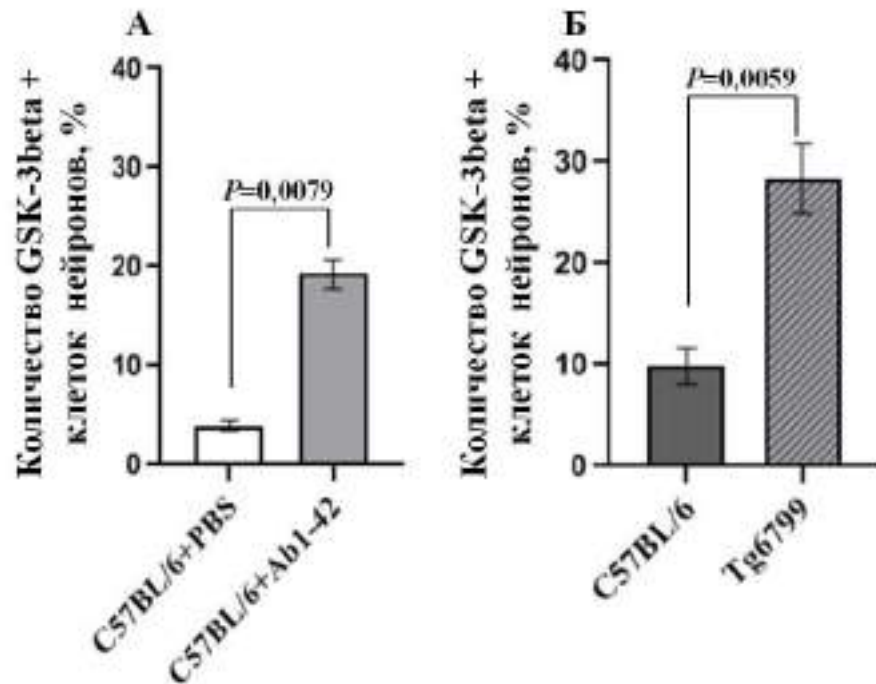


Рисунок 43 – Нарушение экспрессии GSK-3beta на клетках нейрональной природы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия GSK-3beta в миндалевидном теле головного мозга: (А) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) (* $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); (Б) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean±S.E.M. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

Результаты исследования экспрессии IRS1 на зрелых гранулярных нейронах в миндалевидном теле головного мозга мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) показали статистически значимое различие

($21,16 \pm 1,98$) и ($31,67 \pm 2,78$), соответственно, при $P=0,0317$) (рисунок 44 А). При генетической модели болезни Альцгеймера (линия Tg6799) также выявлено значимое ($P=0,0419$) снижение экспрессии IRS1 по сравнению с контрольной группой (C57BL/6) (рисунок 44 Б).

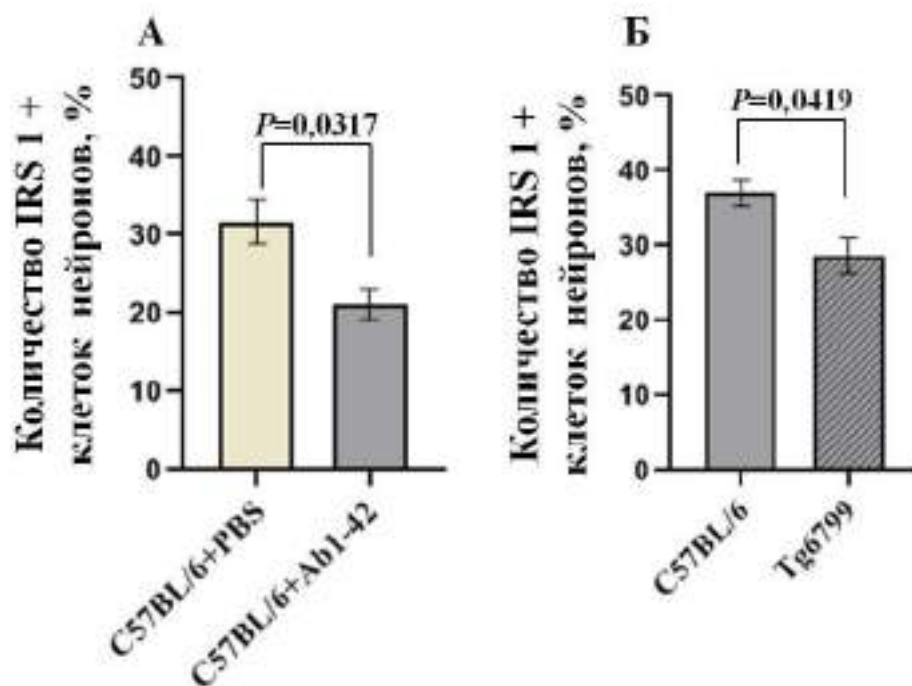


Рисунок 44 – Нарушение экспрессии IRS1 на клетках нейрональной природы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия IRS1 в миндалевидном теле головного мозга: (А) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложнооперированных животных (C57BL/6+PBS) (* $P < 0,05$ – сравнение с ложнооперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); (Б) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $Mean \pm S.E.M.$ Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

Результаты исследования экспрессии молекул - компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках головного мозга при

экспериментальной болезни Альцгеймера опубликованы в статьях «Экспрессия MAPK и инфламмасом в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера»⁵ и «Экспрессия молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера»⁶

На основании выше изложенного можно сделать заключение о том, что моделирование нейродегенерации альцгеймеровского типа сопровождается повышением экспрессии гена инсулина как в гиппокампе, так и миндалевидном теле, что сопряжено с тенденцией повышения уровня инсулина в ткани миндалевидного тела головного мозга, а также выявлением значимого влияния фактора *интрагиппокампальная инъекция × область головного мозга* на уровень инсулина в ткани головного мозга, что в совокупности можно рассматривать как компенсаторный механизм в условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида. Одновременно с этим как в условиях острого токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель болезни Альцгеймера), так и при прогрессировании хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа (генетическая модель болезни Альцгеймера) вниз по сигнальному пути наблюдаются выраженные нарушения в экспрессии молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции (IR, IRS1, MAPK, PKC, GSK3-beta), а также снижение уровня экспрессии молекулы-мишени IRAP в колоколизации с GLUT4, что может вызывать нарушение метаболизма глюкозы (снижение захвата и транспорта глюкозы к нервным клеткам).

При этом развитие aberrантного метаболизма глюкозы в условиях острого действия бета-амилоида вызывает гиперполяризацию мембраны митохондрий, что протекает совместно с увеличением уровня лактата в ткани

⁵ Горина Я.В. [и др.]. Экспрессия MAPK и инфламмасом в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2017. №4(11). С.45-51.

⁶ Горина Я.В. [и др.]. Экспрессия молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2019. №4(13). 1-7.

головного мозга. Это может объясняться включением защитного механизма, при котором лактат, выделяемый астроцитами, активно транспортируется к нейронам в ответ на бета-амилоидный апоптоз нейронов. Кроме того, повышение уровня инсулина в ткани головного мозга может также свидетельствовать о запуске компенсаторного механизма положительной обратной связи в ответ на высокий уровень глюкозы, наблюдаемый при развитии дисметаболизма, что в итоге замыкает патологический круг. В целом, полученные данные указывают о выраженном развитии церебральной инсулинорезистентности при развитии болезни Альцгеймера.

В этом контексте является актуальным и интересным решение вопроса о том, какое влияние оказывает локальная инсулинорезистентность на эффекты бета-амилоида в эндотелиальных клетках церебральных микрососудов и проницаемость ГЭБ при экспериментальной болезни Альцгеймера?

3.3 Оценка изменения проницаемости ГЭБ, церебрального ангиогенеза и микроциркуляции при экспериментальной болезни Альцгеймера, ассоциированной с развитием локальной инсулинорезистентности

На сегодняшний день имеются весьма противоречивые и спорные данные относительно нарушения целостности ГЭБ у пациентов с болезнью Альцгеймера. Так, в ряде исследований было продемонстрировано отсутствие структурно-функциональных нарушений ГЭБ при болезни Альцгеймера [129, 262, 681], тогда как по результатам другого исследования было высказано предположение о том, что повреждение капилляров головного мозга и разрушение ГЭБ является ранним биомаркером когнитивной дисфункции, независимо от эффектов бета-амилоида и тау-белка [571].

Как известно, ГЭБ регулирует транспорт инсулина в головной мозг и, таким образом, принимает непосредственное участие в регулировании его уровня в ЦНС [254], поэтому нарушение структурно-функциональной целостности ГЭБ может оказать значимое влияние и явиться одним из кофакторов развития церебральной инсулинорезистентности. Так, провоспалительные цитокины могут проходить через ГЭБ, запуская каскад патологических реакций, что в свою очередь способствует развитию резистентности мозга к инсулину, митохондриальной дисфункции [296] и накоплению нейротоксических олигомеров бета-амилоида [760], приводя в конечном итоге к нарушению синаптической пластичности, нейрональной дисфункции и гибели нервных клеток. Повышенная выработка церамидов, вызванная нарушением регуляции липидного обмена, также наблюдается при резистентности к инсулину [342], при этом данные молекулы могут проходить через ГЭБ, активировать провоспалительные реакции и нарушать передачу сигналов инсулина в головном мозге [550].

3.3.1 Экспрессия CD31 в субрегионах гиппокампа у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Какое влияние оказывает бета-амилоид на клетки эндотелия церебральных микрососудов на стадии сформировавшихся нейродегенеративных изменений?

Исследование на животных с генетической моделью болезни Альцгеймера продиктовано необходимостью регистрации феномена неангиогенеза при хронической аккумуляции амилоида в ткани головного мозга.

У животных с генетической моделью болезни Альцгеймера выявлено большее снижение количества CD31+ эндотелиальных клеток в зубчатой извилине гиппокампа ($21,50 \pm 0,99$) по сравнению с контрольной группой

($24,31 \pm 1,42$), однако разница не была статистически значимой ($P=0,2297$) (рисунок 45). Подобная картина наблюдалась в CA2 и CA3 областях гиппокампа (рисунок 45). Стоит отметить, что в CA1 области гиппокампа у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера наблюдалось статистически значимое ($P=0,0285$) увеличение количества CD31+клеток ($28,94 \pm 1,72$) по сравнению с контрольной группой ($21,39 \pm 1,76$) (рисунок 45).

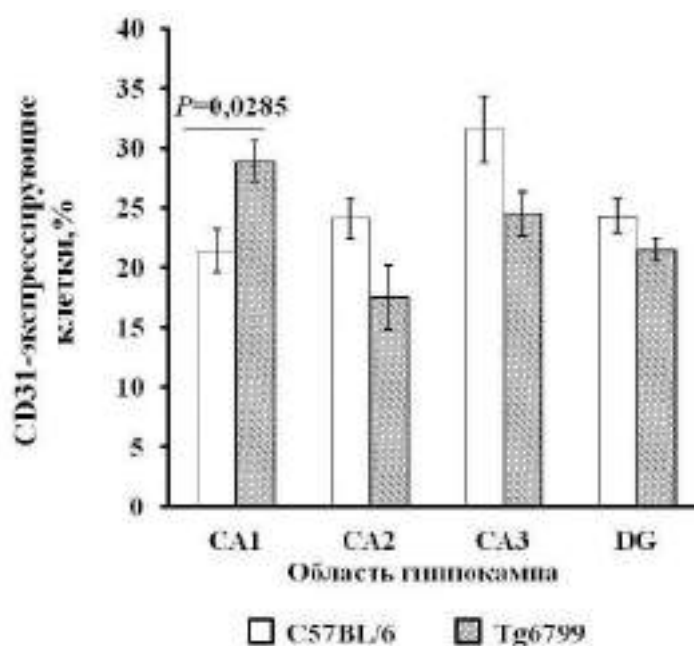


Рисунок 45 – Нарушение экспрессии CD31 у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Экспрессия CD31 в различных областях гиппокампа головного мозга у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группе (линия C57BL/6) ($*P < 0,05$ – сравнение с животными контрольной группы, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$. Количество положительных клеток в процентах от общего числа клеток в одном поле зрения, высчитывали по ядрам DAPI-позитивных клеток, локализующихся в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

Таким образом, нами установлено, что по мере прогрессирования болезни Альцгеймера (у животных с генетической моделью заболевания)

неоангиогенез в гиппокампе подавляется. Исключение составляет CA1 область гиппокампа, в которой высокий уровень экспрессии CD31-позитивных клеток сохраняется.

3.3.2 Особенности формирования сосудистой сети в гиппокампе (ангиогенез и ремоделирование сосудистой сети) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Как показывают экспериментальные исследования, при прогрессировании болезни Альцгеймера в головном мозге наблюдаются различные микрососудистые нарушения, а именно, атрофия сосудов, снижение плотности капилляров и дисфункция эндотелия [772, 776], что в свою очередь способствует развитию когнитивных нарушений [777].

Исследование на животных с генетической моделью болезни Альцгеймера продиктовано необходимостью регистрации феномена ремоделирования сосудов при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга.

Мы изучили ангиогенез и ремоделирование сосудистой сети в гиппокампе головного мозга в норме и у животных со сформировавшимися проявлениями хронической нейродегенерации (линия Tg6799) (**рисунок 47**).

Так, общая длина сосудов в области зубчатой извилины у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера в 2,5 раза больше, чем у животных контрольной группы (C57BL/6) ($P=0,0087$) (**рисунок 46 А**). 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 (**рисунок 46 Б**). 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 болезни Альцгеймера (**рисунок 46 В**). Стоит отметить, что средний диаметр сосудов у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера значимо ($P<0,05$) меньше по сравнению с животными контрольной группы во всех областях гиппокампа (**рисунок 46 Г**).

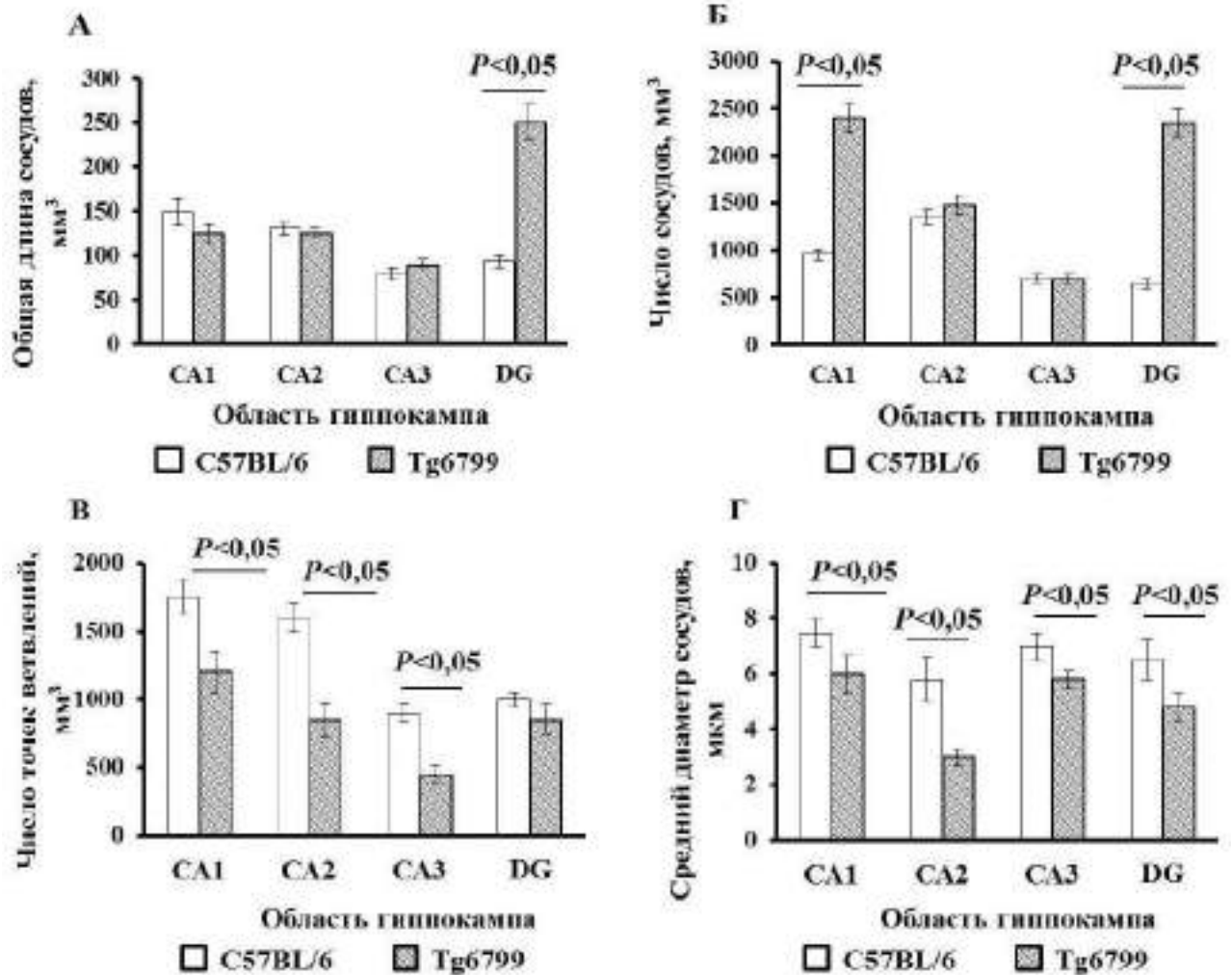


Рисунок 46 – Особенности сосудистой сети (ангиогенеза) в отдельных областях гиппокампа в норме и при экспериментальной болезни

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±S.E.M., n=10. CA1, CA2, CA3 и DG (зубчатая извилина) – области гиппокампа.

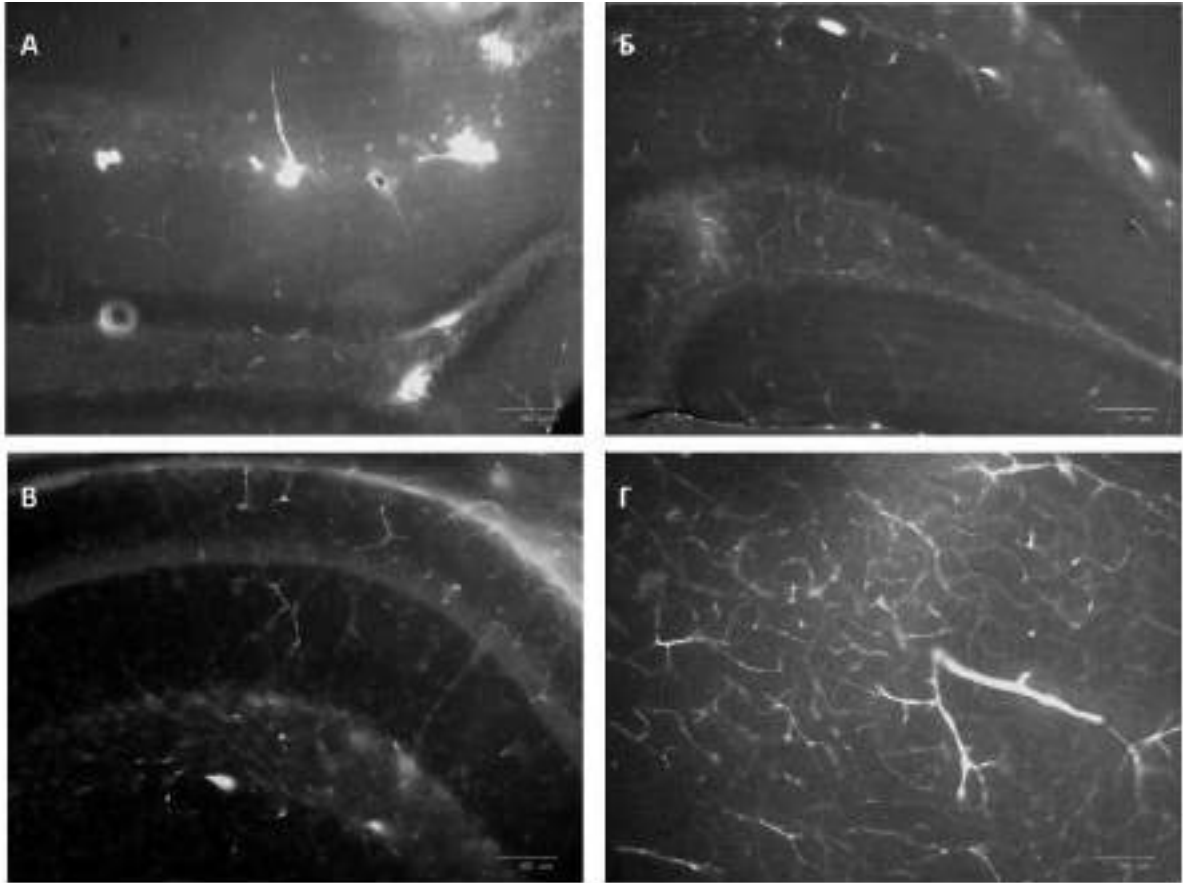


Рисунок 47 – Особенности сосудистой сети (ангиогенеза) в различных областях гиппокампа в норме и при экспериментальной болезни

Альцгеймера

(А) зубчатая извилина у животных контрольной группы (линия C57BL/6); (Б) зубчатая извилина у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799); (В) CA1 область гиппокампа у животных контрольной группы; (Г) CA1 область гиппокампа у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера. Увеличение x175.

Таким образом, у животных со сформировавшимися проявлениями хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа (генетическая модель

заболевания) фиксируются значимые патологические изменения в микрососудистом русле гиппокампа, причем наиболее выраженные в СА1 области гиппокампа.

Результаты исследования изменения проницаемости ГЭБ, церебрального ангиогенеза и микроциркуляции при экспериментальной болезни Альцгеймера опубликованы в статье «Аберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера»⁷

3.3.3 Экспрессия бета-амилоида (Abeta) и Fe65 в клетках эндотелия гиппокампа у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера

Как показывают несколько последних научных исследований [754, 802], накопление бета-амилоида наблюдается в паренхиме и сосудах головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, что дает возможность предполагать о существенном вкладе церебральных сосудистых нарушений, которые, как известно, способствуют накоплению в головном мозге токсичных веществ, и снижению транспорта глюкозы / кислорода в мозг [227, 549, 876].

Насколько значимо присутствие продуктов протеолиза APP в клетках эндотелия при «подостром» токсическом действии бета-амилоида (инъекционная модель болезни Альцгеймера) и хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (генетическая модель болезни Альцгеймера)?

Мы изучили уровень экспрессии бета-амилоида (Abeta) и выявили статистически значимое повышение его экспрессии на клетках эндотелия в гиппокампе головного мозга у животных с инъекционной моделью болезни

⁷ Горина Я.В. [и др.]. Аберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // Бюллетень сибирской медицины = Bulletin of Siberian Medicine = Byulleten Sibirskoy Meditsiny. 2020. №4(19). С. 46-52.

Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) ($12,60 \pm 1,39$) по сравнению с ложно-оперированными животными (C57BL/6+PBS) ($5,85 \pm 0,64$) ($P=0,0003$) (**рисунок 48 А, рисунок 49 А-Б**). Аналогичная ситуация наблюдается и у животных с генетической моделью БА (линия Tg6799): уровень экспрессии бета-амилоида на клетках эндотелия в гиппокампе статистически значимо ($P<0,0001$) выше ($16,62 \pm 1,92$) по сравнению с контрольной группой (C57BL/6) ($4,57 \pm 0,53$) (**рисунок 48 Б, рисунок 49 В-Г**).

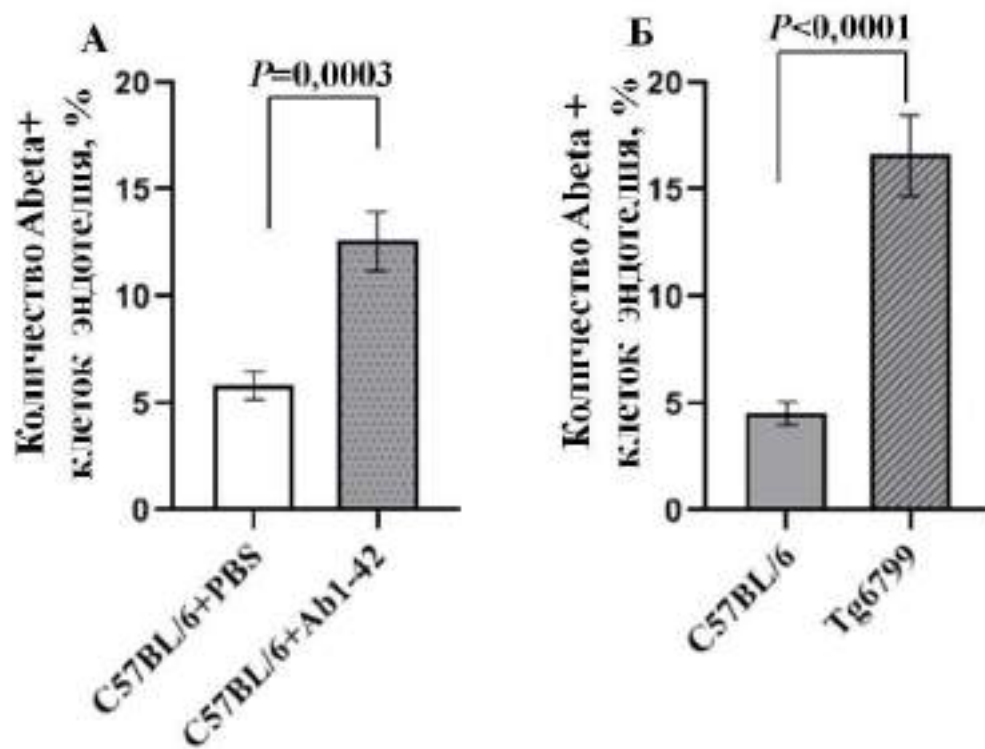


Рисунок 48 – Нарушение экспрессии Abeta на клетках эндотелия при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия Abeta в гиппокампе головного мозга: (А) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) ($*P<0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); (Б) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) ($*P<0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $Mean \pm S.E.M.$ Количество

положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

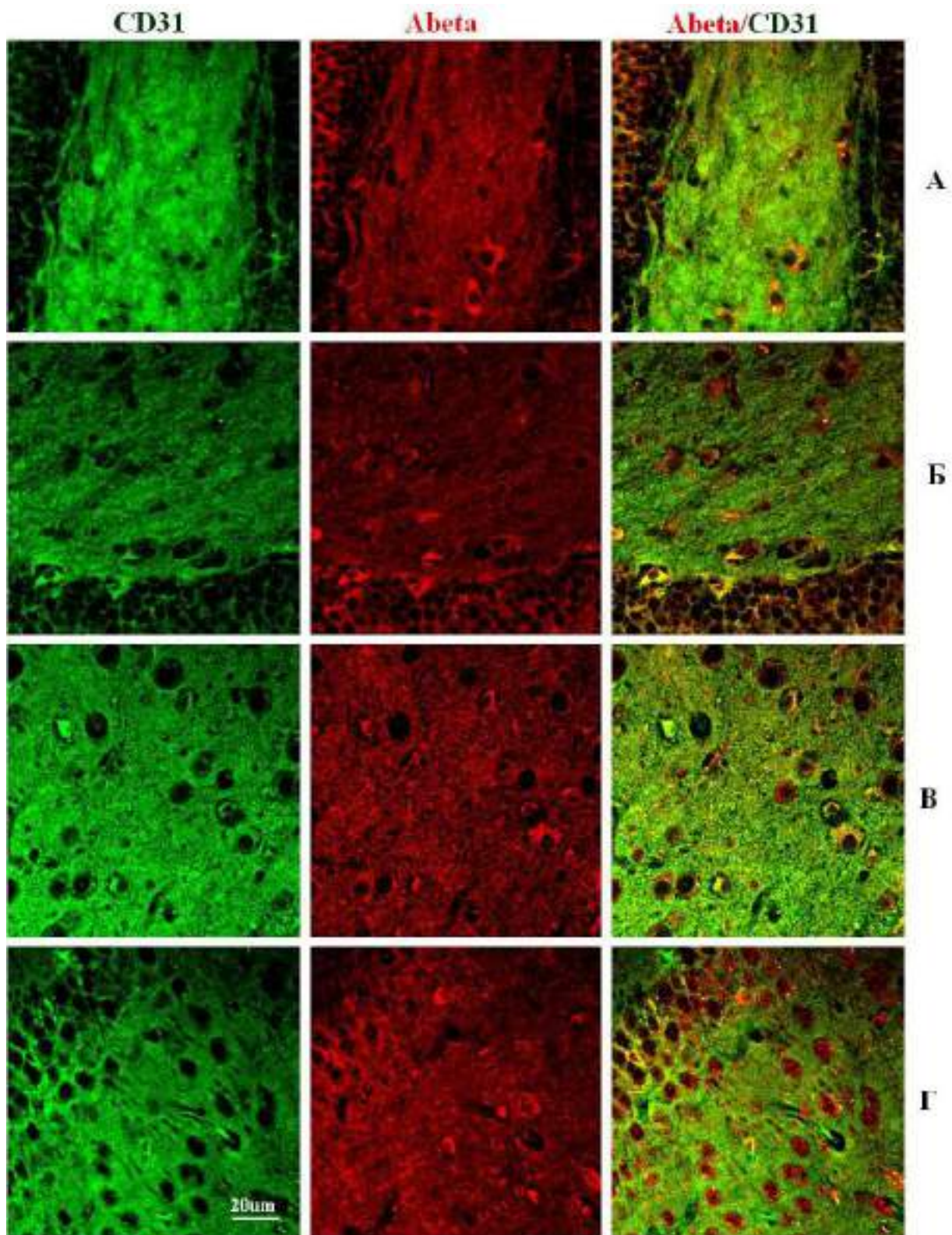


Рисунок 49 – Иммуногистохимический анализ экспрессии Abeta на эндотелиальных клетках в гиппокампе головного мозга животных разных экспериментальных групп

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия Abeta+клеток (красный), CD31+клеток (зеленый) в гиппокампе головного мозга в экспериментальных группах: **(А)** ложно-оперированные животные (C57BL/6+PBS), **(Б)** животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42), **(В)** контрольная группа (линия C57BL/6), **(Г)** животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799).

Как известно, Fe65 является адаптерным белком, который формирует транскрипционно активный комплекс с белком-предшественником бета-амилоида (APP). Кроме того, Fe65 фактически регулирует экспрессию генов, находящихся под контролем APP в клетках-мишенях, и протеолиз APP до бета-амилоида. Считается, что Fe65 играет важную роль в ответе клеток на формирование двуцепочечных разрывов ДНК, распознавании γ H2AX, ацетилировании гистона H4 в участках двуцепочечных разрывов ДНК, индукции апоптоза [305] в нейронах, в том числе при болезни Альцгеймера.

С другой стороны, исследования на экспериментальных животных [150, 736] и в культивируемых клетках [608] подтверждают, что нарушение передачи сигналов инсулина ведет к аномальной обработке APP и накоплению бета-амилоида. Известно, что инсулин через путь PI3K / Akt / GSK-3beta дефосфорилирует APP, что ингибирует транслокацию его внутриклеточного домена из цитоплазмы в ядро, тем самым предотвращая его транскрипционную активность, а именно, взаимодействие с белковым комплексом Fe65 и Tip60, который активирует транскрипцию генов-мишеней, вовлеченных в амилоидогенный путь (GSK-3beta, APP, BACE1) [594].

В меньшей степени изучена роль Fe65 в клетках эндотелия при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа, но так как развитие

нейродегенерации подразумевает аккумуляцию продуктов протеолиза APP и в эндотелии [687], интересным было оценить экспрессию Fe65 в клетках эндотелия гиппокампа.

В ходе исследования экспрессии Fe65 в экспериментальных группах нами было выявлено статистически значимое повышение экспрессии Fe65 в клетках эндотелия в гиппокампе головного мозга у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) ($12,00 \pm 0,92$) по сравнению с ложнооперированными животными (C57BL/6+PBS) ($8,55 \pm 1,35$) ($P=0,0417$) (рисунок 50 А). При этом у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) наблюдался более повышенный уровень экспрессии Fe65 в клетках эндотелия в гиппокампе ($30,00 \pm 1,92$) по сравнению с контрольной группой (C57BL/6) ($23,36 \pm 2,81$), однако разница не была статистически значимой ($P=0,0557$) (рисунок 50 Б).

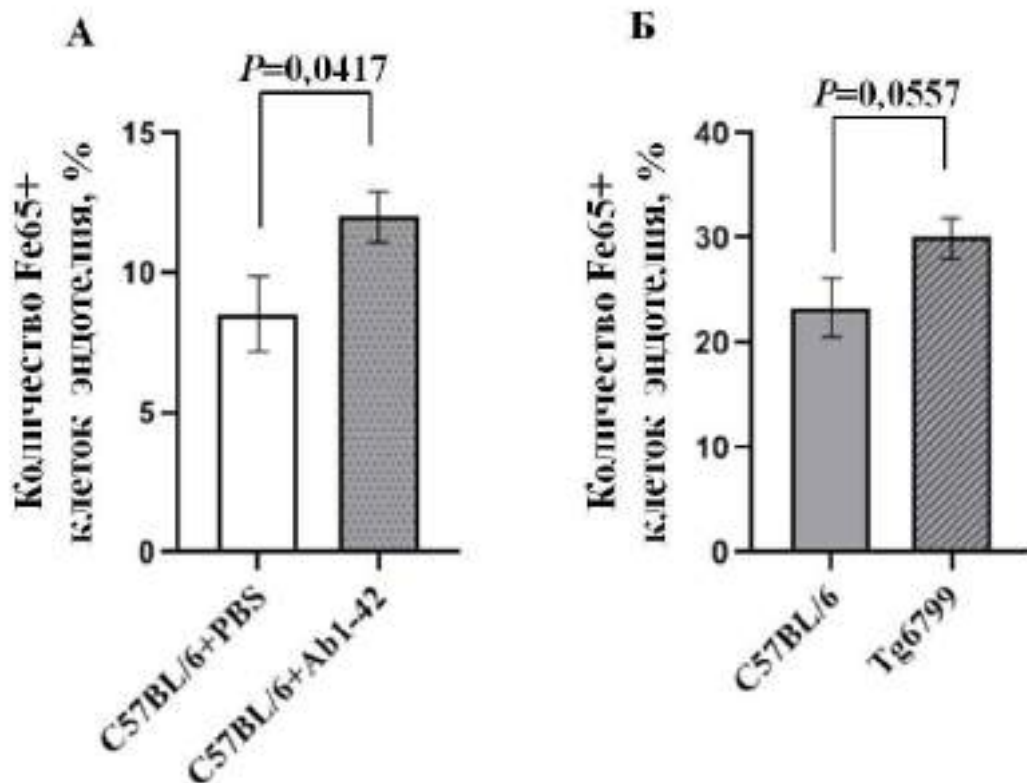


Рисунок 50 – Нарушение экспрессии Fe65 на клетках эндотелия при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия Fe65 в гиппокампе головного мозга: (А) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-

оперированных животных (C57BL/6+PBS) (* $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни); **(Б)** у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) (* $P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 5 полей зрения).

Таким образом, в ходе наших исследований впервые показано, что как при «подостром» токсическом действии бета-амилоида (инъекционная модель болезни Альцгеймера), так и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (генетическая модель болезни Альцгеймера) происходит увеличение экспрессии бета-амилоида и адапторного для APP белка Fe65 в эндотелии гиппокампа в головном мозге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера. Это подразумевает возможность существования самостоятельных механизмов протеолиза APP в церебральном эндотелии, нарушающихся при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Результаты исследования экспрессии бета-амилоида и Fe65 в клетках эндотелия гиппокампа у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера опубликованы в статье «Особенности экспрессии гена инсулина и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-сигнального пути при болезни Альцгеймера»⁸

⁸ Горина Я.В. [и др.]. Особенности экспрессии гена инсулина и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-сигнального пути при болезни Альцгеймера // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2021. №4(6). С. 8-21.

3.3.4 Проницаемость ГЭБ *in vivo* у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Дисфункция ГЭБ наблюдается при деменции, сопровождаемой выраженными сосудистыми изменениями [151, 694], при этом отложение бета-амилоида в микрососудах головного мозга может способствовать развитию церебральной амилоидной ангиопатии [288], которая в свою очередь ассоциирована с повреждением клеточных компонентов (перicyтов и эндотелиальных клеток) ГЭБ [535].

Как же отражается выявленное нами при прогрессировании нейродегенерации альцгеймеровского типа (генетическая модель болезни Альцгеймера) нарушение экспрессии CD31, патологические изменения в микрососудистом русле гиппокампа, сопряженные с увеличением экспрессии бета-амилоида и адапторного для APP белка Fe65 в эндотелии гиппокампа, на проницаемости ГЭБ?

Исследования проводили с использованием животных с генетической моделью болезни Альцгеймера, что продиктовано необходимостью регистрации последствий абберрантного ангиогенеза при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга.

Мы провели оценку проницаемости ГЭБ с помощью красителя Evans blue, который используется как маркер повреждения ГЭБ. Так, у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) установлено значимое ($P=0,0250$) увеличение относительной площади ткани головного мозга, содержащей краситель Evans blue, ($19,78\pm 4,88$) в CA2 области гиппокампа по сравнению с контрольной группой ($3,01\pm 2,33$) (**рисунок 51**).

Сходная картина наблюдалась и в CA1 области гиппокампа ($P=0,0330$) (**рисунок 51**). В то же время в зубчатой извилине гиппокампа у животных с

генетической моделью болезни Альцгеймера не выявлено значимого ($P=0,1490$) изменения относительной площади, содержащей краситель Evans blue, ($10,95\pm 6,21$) при сравнении с контрольной группой ($2,15\pm 1,46$) (рисунок 51). Подобная ситуация ($P=0,1571$) наблюдалась и в СА3 области гиппокампа экспериментальных животных (рисунок 51).

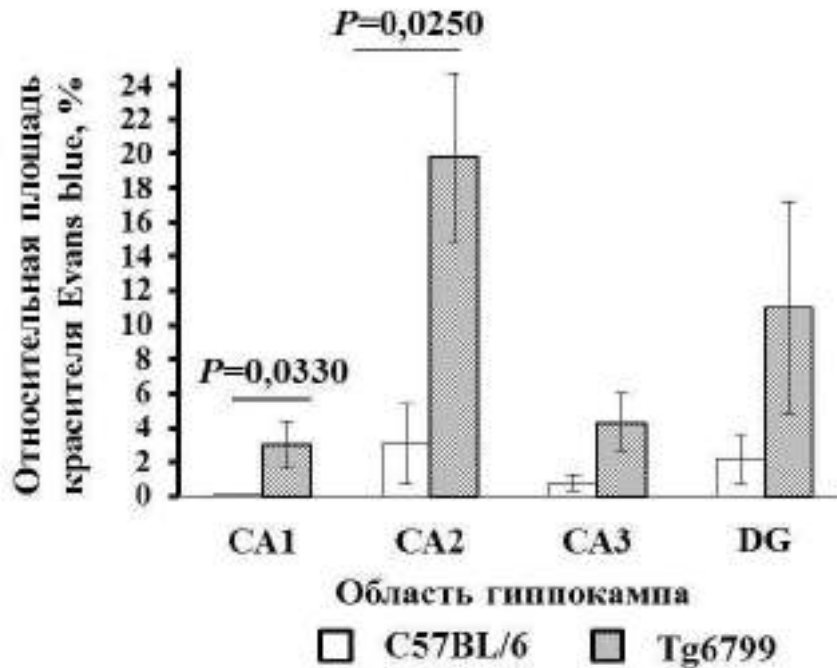


Рисунок 51 – Проницаемость ГЭБ *in vivo* в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

Количество красителя Evans blue в отдельных областях гиппокампа (%) животных контрольной группы (линия C57BL/6) и животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799). (* $P<0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean±S.E.M., n=10. CA1, CA2, CA3 и DG (зубчатая извилина) – области гиппокампа.

В целом, наши результаты свидетельствуют о том, что при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (с использованием

генетической модели заболевания) увеличение проницаемости ГЭБ наиболее характерно для СА2 области гиппокампа, в меньшей степени – для СА1 области, и, весьма вероятно, для зубчатой извилины гиппокампа.

Результаты исследования проницаемости ГЭБ *in vivo* у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера опубликованы в статье «Аберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера»⁹

3.3.5 Экспрессия RAGE-белков на клетках эндотелия у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Известно, что отложение бета-амилоида в церебральной сосудистой сети способствует уменьшению размера просвета кровеносного сосуда, нарушению базальной мембраны и дегенерации эндотелия [399]. Кроме того, взаимодействие бета-амилоида с RAGE, который экспрессируется как на эндотелиальных клетках, так и на нейронах и микроглии, запускает клеточную сигнализацию, которая приводит к активации окислительного стресса, и как следствие, образованию липидных пероксидов и индукции транскрипционного фактора NF-κB [137]. Примечательно, что накопление бета-амилоида также приводит к нарушению структурной целостности перицитов и клеток эндотелия, таким образом способствуя повреждению ГЭБ [226]. При этом белок RAGE, возможно, может выступать в качестве одного из ключевых факторов, опосредующих цитотоксичность бета-амилоида [141].

⁹ Горина Я.В. [и др.]. Аберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // Бюллетень сибирской медицины = Bulletin of Siberian Medicine = Byulleten Sibirskoy Meditsiny. 2020. №4(19). С. 46-52.

Важно отметить и тот установленный факт, что увеличение экспрессии RAGE характерно не только для воспаления, но также может быть связано с развитием инсулинорезистентности в головном мозге [791], что, по аналогии с другими тканями, может быть ассоциировано с накоплением конечных продуктов гликирования белков, являющихся лигандами RAGE.

Поскольку бета-амилоид также является эндогенным лигандом RAGE белков, мы изучили уровень экспрессии RAGE в условиях хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга и выявили статистически значимое повышение экспрессии RAGE на клетках эндотелия в гиппокампе головного мозга у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) ($18,08 \pm 1,36$) по сравнению с контрольной группой (линия C57BL/6) ($8,73 \pm 0,98$) ($P=0,0002$) (рисунок 52, рисунок 53).

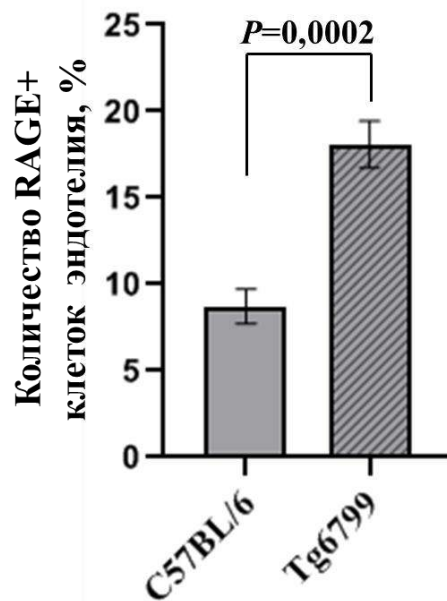


Рисунок 52 – Нарушение экспрессии RAGE на клетках эндотелия при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия RAGE в гиппокампе головного мозга: у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) ($*P<0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде Mean±S.E.M. Количество

положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

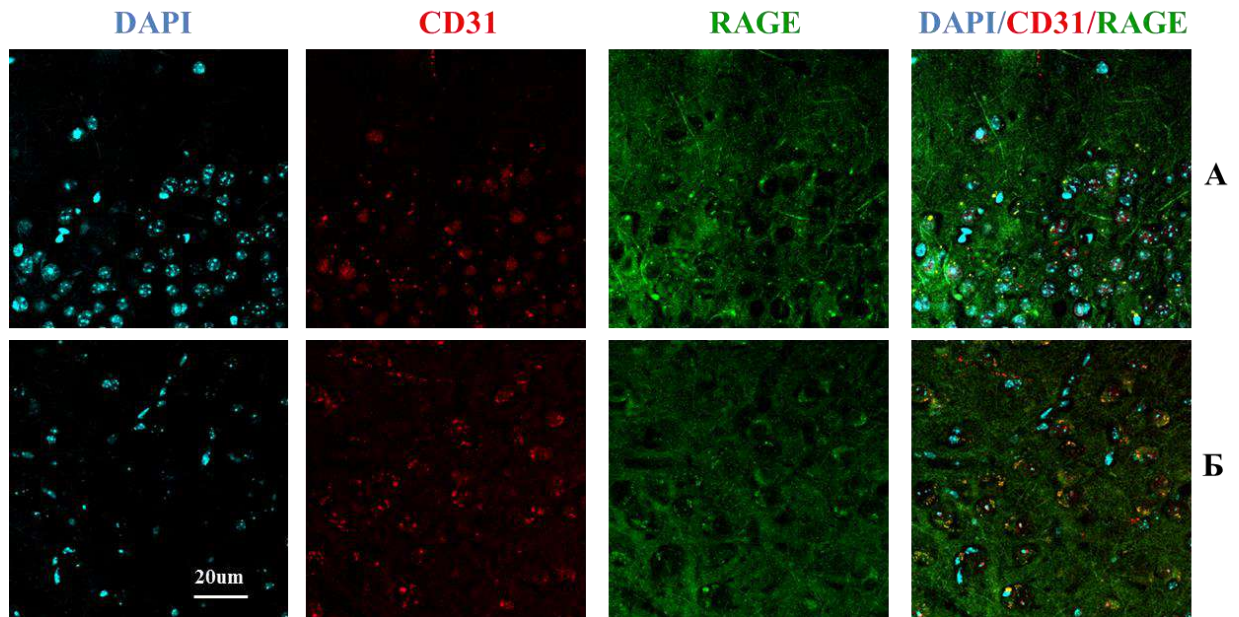


Рисунок 53 – Иммуногистохимический анализ экспрессии RAGE на эндотелиальных клетках в гиппокампе головного мозга животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия CD31+клеток (красный), RAGE+клеток (зеленый), DAPI-ядра (голубой) в гиппокампе головного мозга в экспериментальных группах: (А) контрольная группа (линия C57BL/6) (Б) животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799).

Таким образом, нами установлено, что нейродегенерация альцгеймеровского типа (в условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга) сопровождается нарушением инсулин-сигнальной трансдукции как по PI3K-, так и MAPK-пути, которое приводит к накоплению Abeta и увеличению уровня адапторного для APP белка Fe65 в эндотелии гиппокампа в головном мозге, что в свою очередь может быть связано с возможным 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 активируют образование и отложение бета-амилоида. При этом в условиях хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга это сопряжено с подавлением неоангиогенеза за счет снижения экспрессии CD31 в гиппокампе, а также выраженными церебральными микрососудистыми нарушениями, что в совокупности вызывает повышение проницаемости ГЭБ.

Кроме того, в условиях хронической аккумуляции бета-амилоида (генетическая модель заболевания) выявленное нами нарушение церебрального метаболизма глюкозы, обусловленное патологическими изменениями инсулин-сигнализации, приводит к накоплению конечных продуктов гликирования RAGE на эндотелиальных клетках в гиппокампе, которые индуцируют отложение бета-амилоида в эндотелии церебральных микрососудов, что в свою очередь вызывает церебральные сосудистые нарушения, наблюдаемые при развитии болезни Альцгеймера.

3.4 Оценка роли RAGE-опосредованных механизмов в регуляции проницаемости ГЭБ и ангиогенеза в норме и при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro*

Установленная нами гиперэкспрессия конечных продуктов гликирования RAGE на эндотелиальных клетках в гиппокампе животных с генетической моделью болезни Альцгеймера, связанная с патологическими изменениями метаболизма глюкозы вследствие нарушения передачи сигналов инсулина в головном мозге, дало нам право изучить влияние RAGE на клетки эндотелия церебральных микрососудов, ангиогенез и структурную целостность ГЭБ в норме и при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro*.

3.4.1 Оценка экспрессии RAGE в клетках эндотелия церебральных микрососудов, маркера ангиогенеза (VEGFR2), белков плотных и адгезивных контактов церебрального эндотелия (JAM1 и ZO1)

При оценке особенностей экспрессии целевых молекул (RAGE, VEGFR2, JAM1, ZO1) в эндотелиоцитах, которые культивировались в условиях статической и динамической моделей ГЭБ *in vitro*, мы обнаружили, что в контрольной группе I (интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях закрытой динамической модели ГЭБ) произошло статистически значимое увеличение числа эндотелиальных клеток, экспрессирующих VEGFR2, JAM1 и ZO1 по сравнению с контрольной группой II (интактные эндотелиоциты, которые культивировались в условиях статической модели ГЭБ) (**рисунок 54 А**).

Однако при моделировании экспериментальной болезни Альцгеймера (инкубация клеток с Аβ1-42 в концентрации 10 мкМ) в условиях статической и динамической моделей ГЭБ *in vitro* (опытные группы I и II, соответственно) статистически значимых различий не наблюдалось (**рисунок 54 Б**).

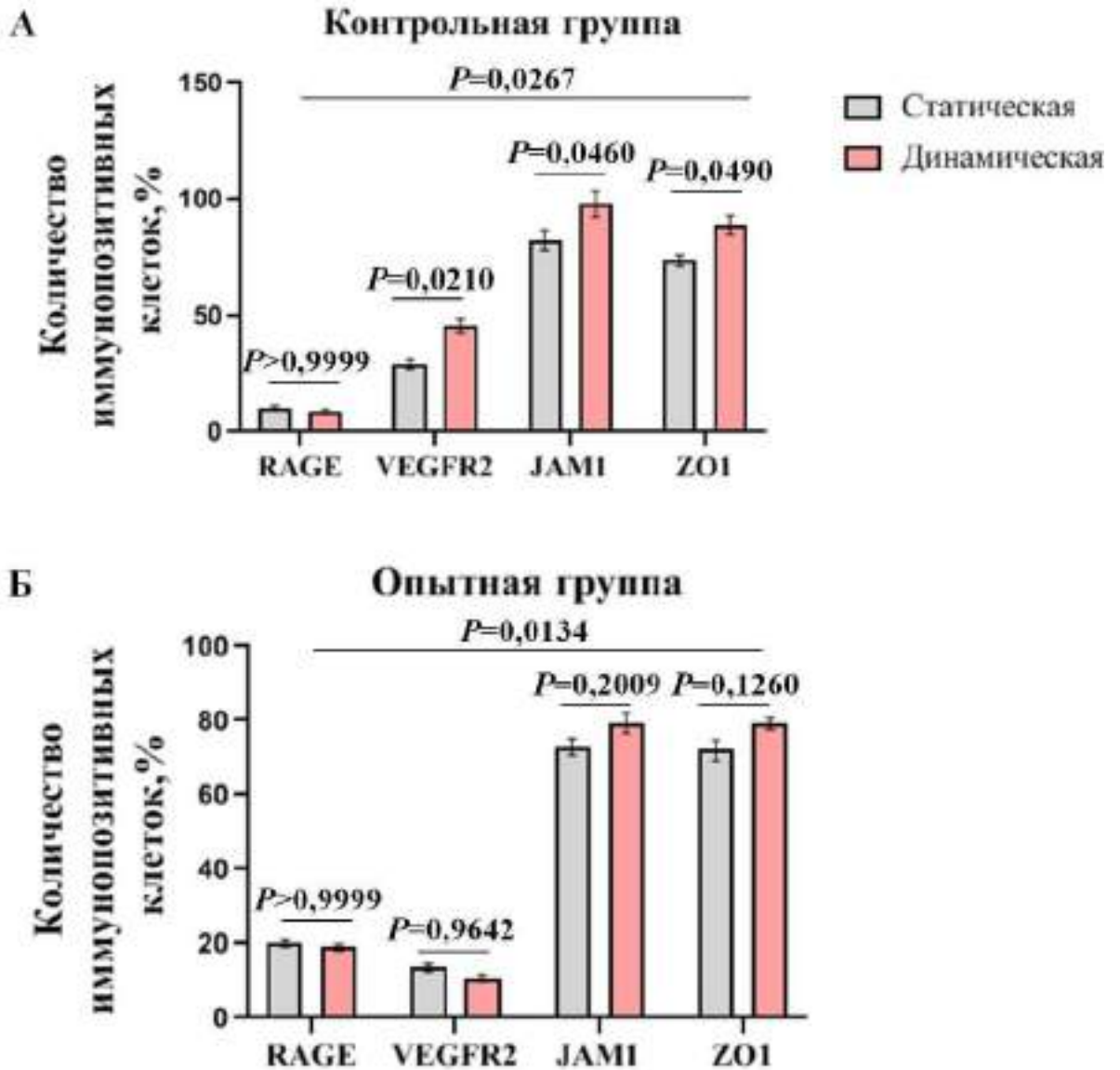


Рисунок 54 – Сравнительный анализ экспрессии RAGE, VEGFR2, JAM1 и ZO1 в статической и закрытой динамической моделях ГЭБ *in vitro* в норме и при моделировании болезни Альцгеймера

Экспрессия RAGE, VEGFR2, JAM1 и ZO1: (А) интактными эндотелиоцитами при культивировании в статической и закрытой динамической моделях ГЭБ *in vitro*. Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Sidak тестом множественных сравнений, взаимное влияние *Модель ГЭБ* × *Молекула-маркер* ($F_{(3,72)}=3,25$, $P=0,0267$), фактор *Модель ГЭБ* ($F_{(1,72)}=23,87$, $P<0,0001$) и фактор *Молекула-маркер* ($F_{(3,72)}=25,68$, $P<0,0001$). (Б) эндотелиоцитами, которые

культивировались в статической и закрытой динамической моделях ГЭБ *in vitro* в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 (моделирование экспериментальной БА). Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, взаимное влияние *Модель ГЭБ* × *Молекула-маркер* ($F_{(3,68)}=3,84$, $P=0,0134$) и фактор *Молекула-маркер* ($F_{(3,68)}=72,56$, $P<0,0001$). Данные представлены в виде Mean ± S.E.M.

Важно отметить, 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, кроме RAGE (рисунок 55).

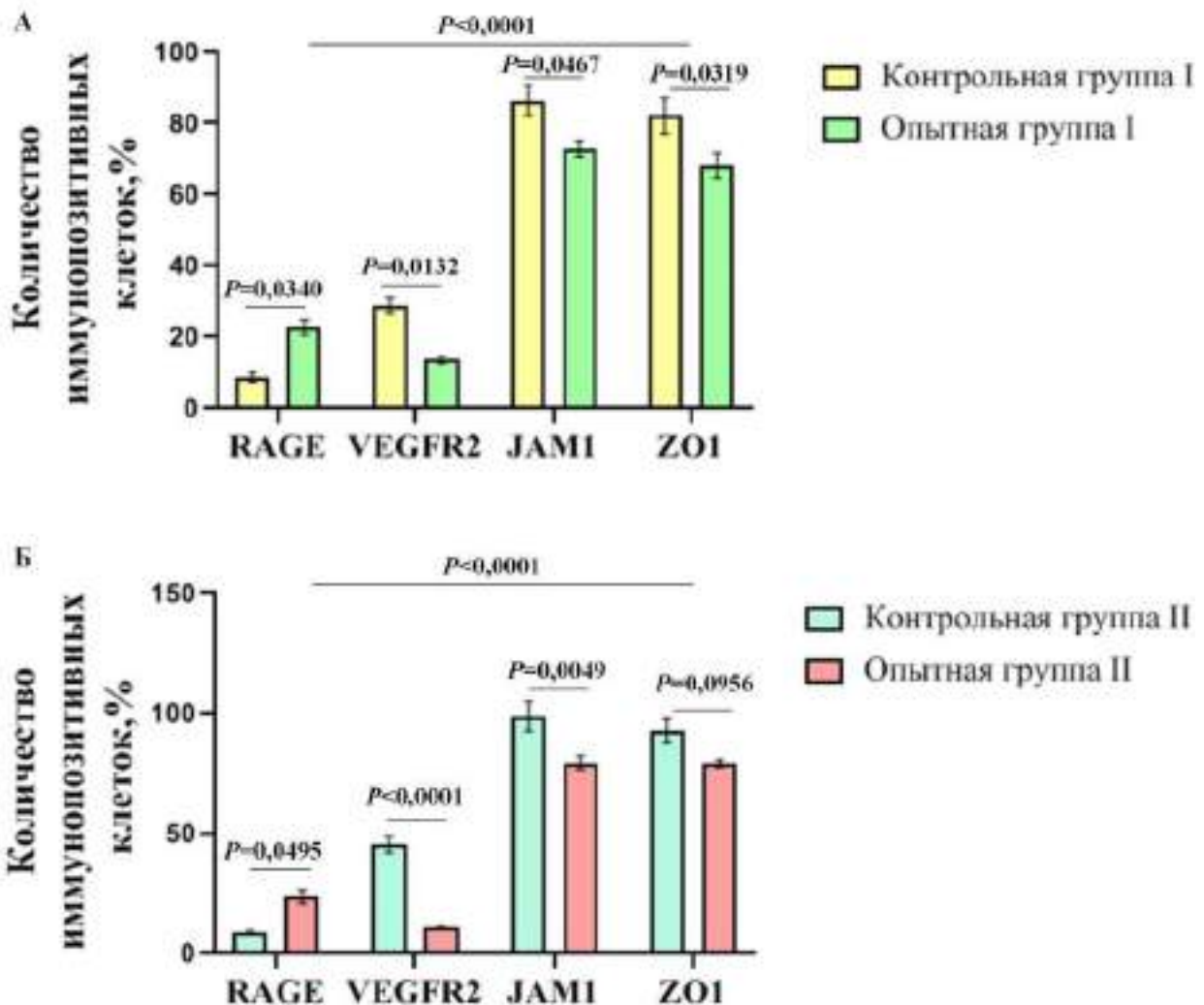


Рисунок 55 – Нарушение экспрессии RAGE, VEGFR2, JAM1 и ZO1 в статической и закрытой динамической моделях ГЭБ *in vitro* при моделировании болезни Альцгеймера

Экспрессия RAGE, VEGFR2, JAM1 и ZO1 интактными эндотелиоцитами и эндотелиоцитами, которые культивировались в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 (моделирование экспериментальной БА): (А) в статической модели ГЭБ *in vitro*. Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, взаимное влияние *Aβ1-42*×*Молекула-маркер* ($F_{(3,72)}=10,94$, $P<0,0001$), фактор *Aβ1-42* ($F_{(1,72)}=11,43$, $P=0,0012$ и фактор *Молекула-маркер* ($F_{(3,72)}=25,83$, $P<0,0001$). (Б) в закрытой динамической модели ГЭБ *in vitro* в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 (моделирование экспериментальной БА). Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey's тестом множественных сравнений, взаимное влияние *Aβ1-42*×*Молекула-маркер* ($F_{(3,66)}=18,30$, $P<0,0001$), фактор *Aβ1-42* ($F_{(1,66)}=29,22$, $P<0,0001$) и фактор *Молекула-маркер* ($F_{(3,66)}=24,95$, $P<0,0001$). Данные представлены в виде Mean±S.E.M.

Нами установлено, что при моделировании экспериментальной болезни Альцгеймера наблюдается статистически значимое ($P<0,05$) снижение величины ТЭС как в статической, так и открытой динамической моделях ГЭБ *in vitro*, что согласуется с повышенной проницаемостью ГЭБ за счет нейротоксического действия бета-амилоида. Кроме того, при культивировании клеток в открытой динамической модели ГЭБ выявлено статистически значимое ($P<0,05$) повышение величины ТЭС в контрольной группе и при моделировании болезни Альцгеймера по сравнению со статической моделью ГЭБ (рисунок 56).

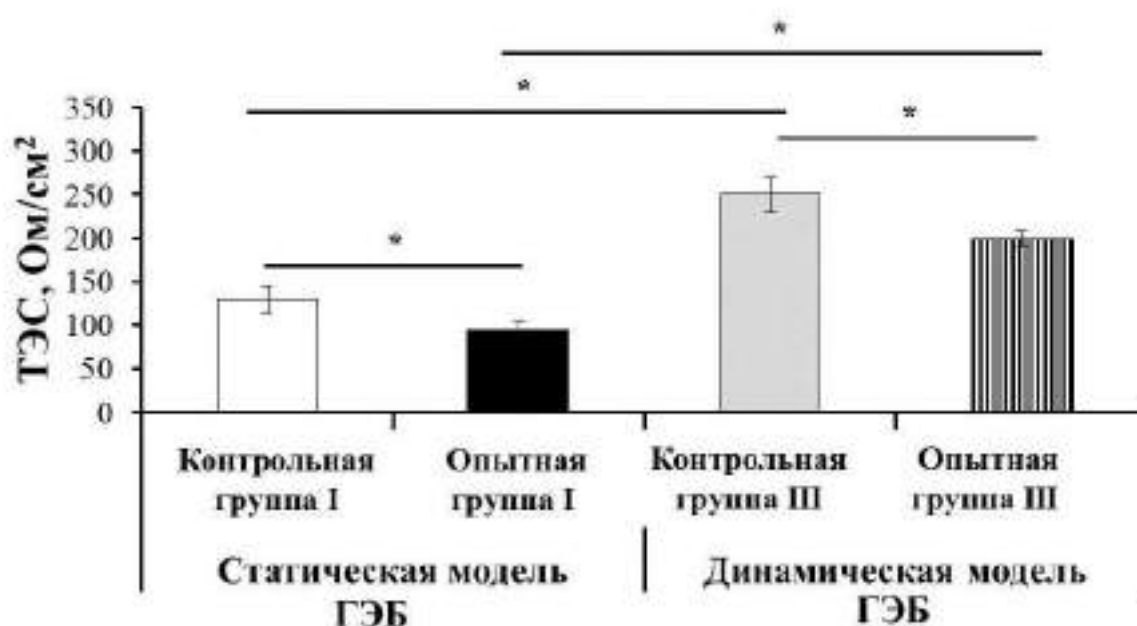


Рисунок 56 – Изменение ТЭС в статической и открытой динамической моделях ГЭБ *in vitro* в контрольных и опытных группах

* $P < 0,05$ – сравнение между группами, U-критерий Манна-Уитни).
Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$.

Таким образом, моделирование болезни Альцгеймера *in vitro* позволило установить, что в эндотелии подавляются процессы, связанные с рекрутингом клеток-предшественников и продукцией VEGFR2, увеличивается экспрессия RAGE рецепторов, ответственных за транспорт бета-амилоида и развитие воспаления, выражено снижается величина ТЭС, что находит свое отражение в эндотелиальной дисфункции и увеличении проницаемости ГЭБ *in vivo*.

В целом, статическая и динамическая модели ГЭБ показывают сходные в качественном и количественном аспектах характеристики как в физиологических условиях, так и при моделировании болезни Альцгеймера (эндотелиотоксический эффект бета-амилоида) *in vitro*, что дает возможность их рекомендовать для решения задач нейробиологии и нейрофармакологии при изучении хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа.

3.4.2 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 бета-амилоида. При этом выбор модели болезни Альцгеймера диктуется протоколом моделирования ГЭБ *in vitro*.

При изучении эффектов модуляции RAGE в культуре эндотелиальных клеток без воздействия siRNA или химических модуляторов (интактные), с использованием A β 1-42 как лиганда RAGE, а также соответствующей siRNA для ингибирования экспрессии RAGE, нами были установлены изменения величины ТЭС. Ингибирование экспрессии RAGE привело к статистически значимому повышению величины ТЭС в первые часы эксперимента, с последующим ее снижением к концу суток. При культивировании эндотелиальных клеток в присутствии A β 1-42 (лиганда RAGE) нами не выявлено статистически значимого его влияния на величину ТЭС (**рисунок 57 А**).

В то же время при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro*, нами установлено, что ингибирование экспрессии RAGE вызывает более стойкое и длительное увеличение величины ТЭС, тогда как добавление лиганда RAGE – A β 1-42 приводит к снижению величины ТЭС к концу 24 ч после его внесения в культуру клеток (**рисунок 57 Б**).

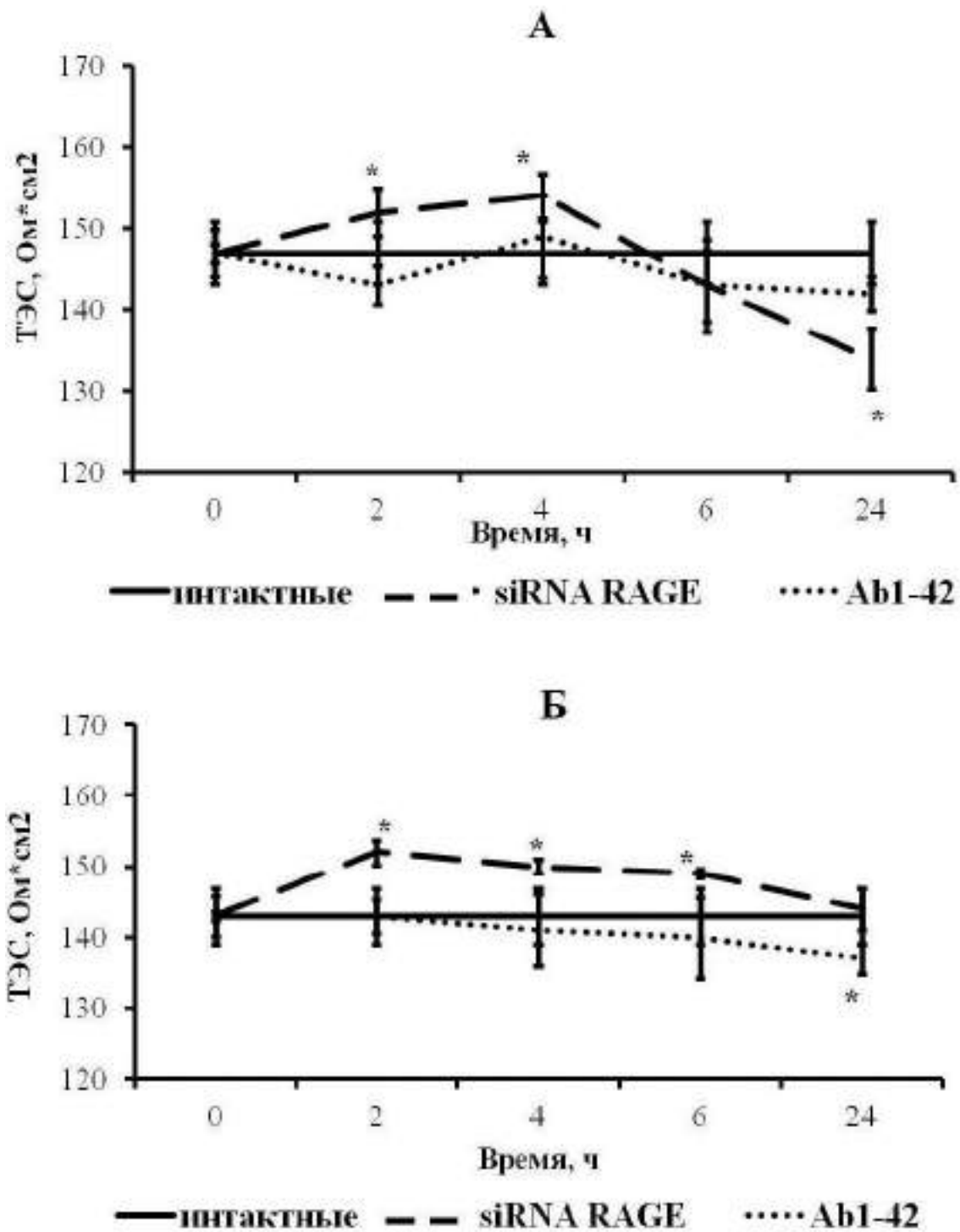


Рисунок 57 – Влияние модуляторов RAGE на величину ТЭС в открытой динамической модели ГЭБ *in vitro*

(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 экспериментальной БА). * $P < 0,05$ – сравнение между группами, U-критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде Mean±S.E.M.

Таким образом, при реализации эндотелиотоксического влияния бета-амилоида в экспериментальной модели болезни Альцгеймера *in vitro*, блокирование экспрессии RAGE приводит к выраженному повышению величины ТЭС в динамической модели ГЭБ *in vitro*. Аналогичный эффект наблюдается и в интактных эндотелиоцитах с подавленной экспрессией RAGE.

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

Выбор модели болезни Альцгеймера *in vitro* для оценки проницаемости эндотелиальных клеток ГЭБ для высокомолекулярных соединений *in vitro* при модуляции RAGE диктуется протоколом моделирования ГЭБ *in vitro*.

При изучении проницаемости клеток эндотелия ГЭБ в группе, в которой клетки были выделены от ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) модуляция RAGE показала, что добавление siRNA RAGE, а также культивирование в присутствии Аβ1-42 привело к повышению проницаемости эндотелиоцитов для FITC-декстрана (**рисунок 58 А**).

При анализе особенностей проницаемости ГЭБ в группе, в которой клетки, которые были выделены от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Аβ1-42) 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 болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42) оказалось более выраженным по сравнению с ложно-оперированными животными (рисунок 58 Б).

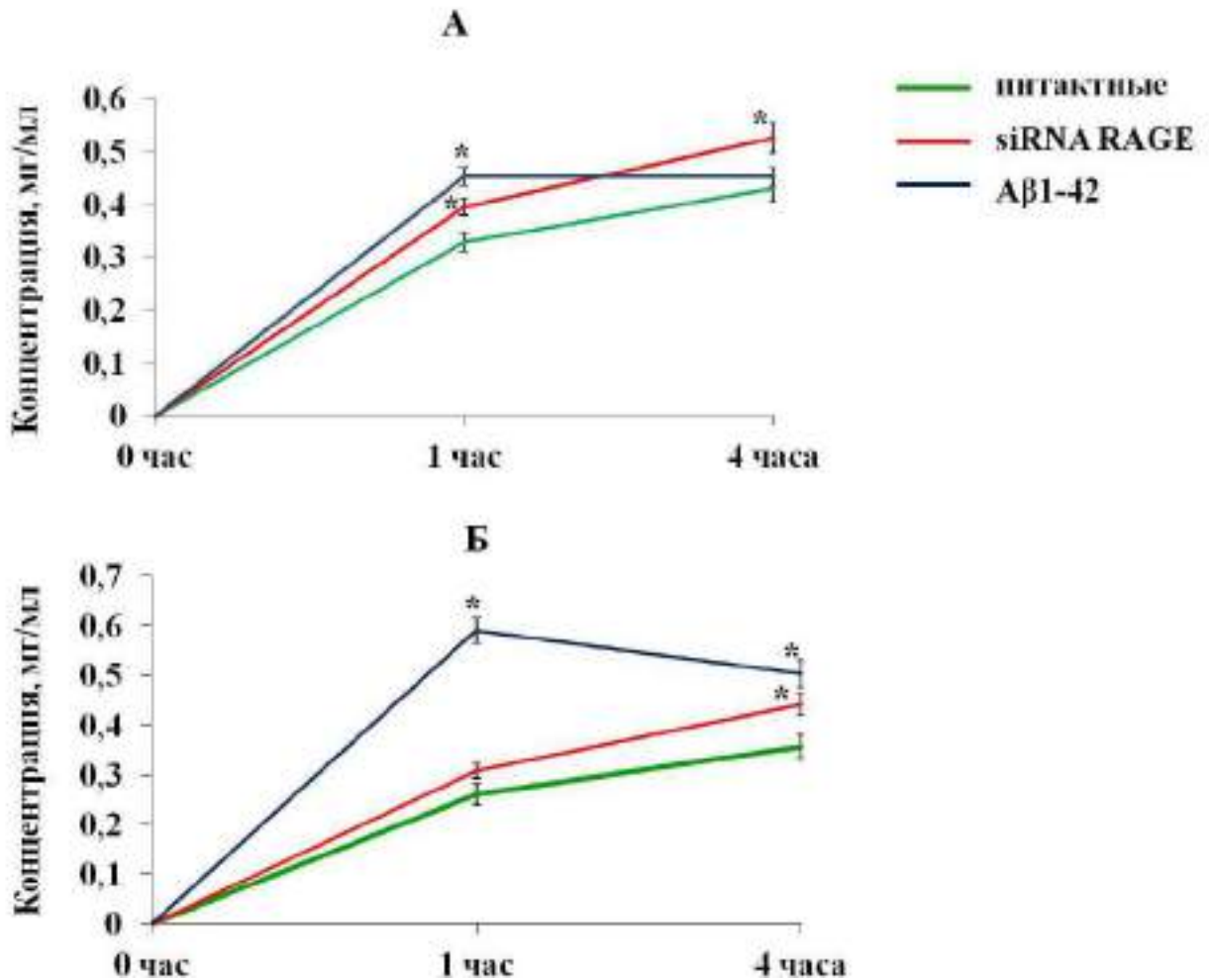


Рисунок 58 – Изменение проницаемости эндотелиоцитов для FITC-декстрана при воздействии модуляторов RAGE (siRNA RAGE и A β 1-42) в норме и при болезни Альцгеймера

(А) эндотелиоциты, которые выделены от ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS): интактные – культура эндотелиоцитов без воздействия химических модуляторов и siRNA, siRNA RAGE – эндотелиоциты после добавления siRNA RAGE, A β 1-42 – эндотелиоциты после добавления лиганда RAGE – A β 1-42; (Б) эндотелиоциты, которые выделены от животных с

инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42). * $P < 0,05$ – сравнение с интактной группой, U-критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде Mean \pm S.E.M.

Таким образом, при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro* нами установлено, что блокирование экспрессии RAGE приводит к повышению проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений (FITC-декстрана). Аналогичный эффект однако и в меньшей степени был зафиксирован в клетках эндотелия ГЭБ в группе, в которой клетки были выделены от ложно-оперированных животных.

3.4.4 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 маркеров ангиогенеза VEGFR2 и CD34 на клетках церебрального эндотелия, выделенных от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS). При этом выбор модели болезни Альцгеймера диктуется протоколом моделирования ГЭБ *in vitro*.

Так, изучая особенность экспрессии VEGFR2 эндотелиоцитами, которые были выделены от животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера, при модуляции RAGE, было установлено значимое снижение количества эндотелиоцитов, экспрессирующих VEGFR2, как после добавления siRNA RAGE, так и при культивировании в присутствии A β 1-42 (лиганда RAGE) по сравнению с ложно-оперированными животными (**рисунок 59 А**). Однако экспрессия VEGFR2 эндотелиоцитами без воздействия химических

модуляторов и siRNA RAGE значимо увеличивалась по сравнению с ложно-оперированными животными (**рисунок 59 А**).

Изучая особенность экспрессии CD34 как маркера неоангиогенеза, т.н. tip cells [303] эндотелиоцитами, выделенными от ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS), при RAGE-модуляции мы обнаружили значительное повышение количества эндотелиальных клеток, экспрессирующих CD34, при добавлении в культуру лиганда RAGE – A β 1-42. При этом культивирование эндотелиальных клеток в присутствии siRNA RAGE не оказало значимого влияния на уровень CD34-иммунопозитивных клеток (**рисунок 59 Б**).

Кроме того установлено, что уровень экспрессии CD34 эндотелиоцитами, выделенными от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42), без добавления химических модуляторов и siRNA RAGE статистически значимо ниже по сравнению с ложно-оперированными животными (**рисунок 59 Б**). Аналогичная ситуация наблюдается и при воздействии A β 1-42. При этом добавление siRNA RAGE не оказывает значимого влияния на уровень экспрессии CD34 эндотелиоцитами, выделенными от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42) (**рисунок 59 Б**).

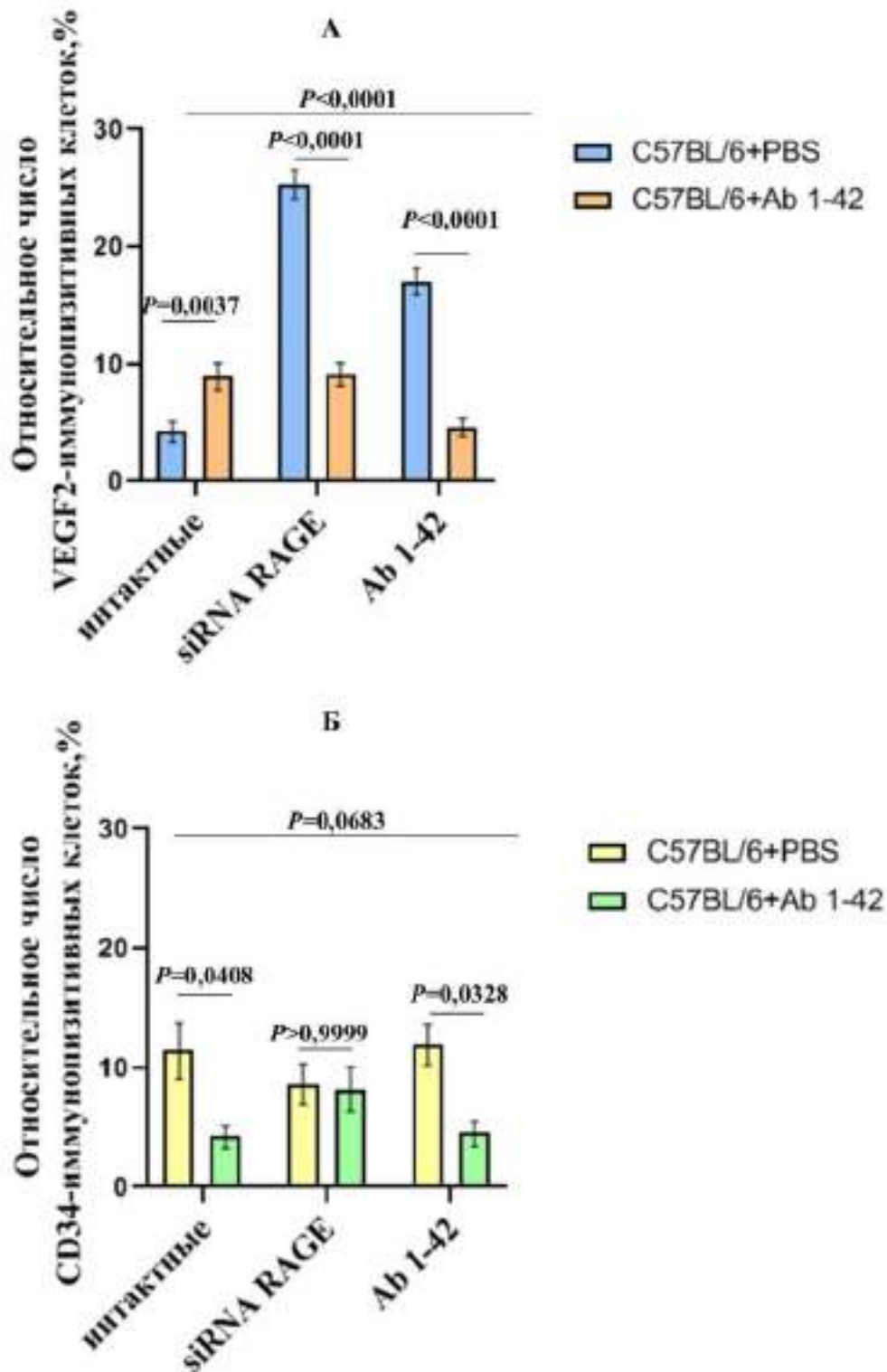


Рисунок 59 – Нарушение экспрессии VEGFR2 и CD34 на эндотелии церебральных сосудов в составе модели ГЭБ *in vitro* при моделировании болезни Альцгеймера под воздействием RAGE-модуляторов

(А) Изменение экспрессии VEGFR2 эндотелиоцитами, выделенными от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42) и

ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS), под воздействием RAGE-модуляторов (siRNA RAGE - малая интерферирующая РНК RAGE, A β 1-42 – лиганд RAGE). Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Sidak тестом множественных сравнений, взаимное влияние *моделирование болезни Альцгеймера* × *химический модулятор* ($F_{(2,54)}=56,16$, $P<0,0001$), фактор *моделирование болезни Альцгеймера* ($F_{(1,54)}=86,27$, $P<0,0001$) и фактор *химический модулятор* ($F_{(2,54)}=52,09$, $P<0,0001$). (Б) Изменение экспрессии CD34 эндотелиоцитами, выделенными от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+A β 1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS), под воздействием RAGE-модуляторов (siRNA RAGE - малая интерферирующая РНК RAGE, A β 1-42 – лиганд RAGE). Непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с последующим Tukey тестом множественных сравнений, влияние фактора *моделирование болезни Альцгеймера* ($F_{(1,54)}=13,33$, $P=0,0006$). Данные представлены в виде Mean \pm S.E.M.

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*. В условиях развития амилоидной ангиопатии при 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.

Примечательно и то, что однонаправленный характер носит экспрессия CD34 эндотелиоцитами, выделенными от животных с инъекционной моделью

болезни Альцгеймера, как без добавления химических модуляторов, так и с их присутствием в культуре клеток.

В целом, моделирование болезни Альцгеймера *in vitro* сопровождается нарушением в эндотелии церебральных микрососудов экспрессии VEGFR2 (что может отражать несовершенный ангиогенез, выявленный нами *in vivo*), увеличением уровня экспрессии RAGE, принимающего участи в транспорте бета-амилоида и развитии воспаления (что соответствует результатам, полученным *in vivo*). Это находит свое отражение в эндотелиальной дисфункции, и сопровождается увеличением проницаемости ГЭБ, что характерно для развития церебральной амилоидной ангиопатии. При этом ингибирование экспрессии RAGE вызывает повышение величины ТЭС, тем самым препятствуя развитию патологической проницаемости ГЭБ *in vitro*. Подобный эффект наблюдается и эндотелиоцитах, выделенных от ложно-оперированных животных, при подавлении экспрессии RAGE, что может свидетельствовать о том, что физиологический уровень экспрессии RAGE увеличивает пассивную парацеллюлярную проницаемость ГЭБ. Кроме того, блокирование экспрессии RAGE как инструмент управления проницаемостью ГЭБ для высокомолекулярных соединений наиболее эффективно себя проявил именно при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro* на фоне развития амилоидной ангиопатии, нежели в эндотелии, выделенном от ложно-оперированных животных.

Примечательным является и установленный нами факт, что на фоне подавления экспрессии RAGE в церебральном эндотелии, выделенном от ложно-оперированных животных, существенно возрастает количество VEGFR2-иммунопозитивных клеток. Аналогичный эффект регистрируется при краткосрочном действии лиганда RAGE – A β 1-42 *in vitro*. Это может свидетельствовать о супрессивном влиянии RAGE на процессы ангиогенеза. Однако при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro* блокирование экспрессии RAGE, а также добавление лиганда не приводит к реализации

данного эффекта, при этом исходный уровень экспрессии эндотелиальных клеток с VEGFR2 значимо выше, чем в эндотелии, выделенном от ложнопонируемых животных, что подтверждает наши наблюдения *in vivo* по стимуляции ангиогенеза при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Указанные церебральные сосудистые нарушения при моделировании болезни Альцгеймера, регистрируются на фоне развития локальной инсулинорезистентности, что может свидетельствовать о дисметаболизме глюкозы в аффецированных регионах головного мозга, провоцируя гиперэкспрессию конечных продуктов гликирования RAGE на эндотелиальных клетках, что в свою очередь активирует транспорт и накопление бета-амилоида в эндотелии церебральных микрососудов, вызывая развитие церебральной амилоидной ангиопатии.

Кроме того, выявленное нами нарушение церебрального метаболизма глюкозы, обусловленное патологическими изменениями инсулин-сигнализации, приводит к накоплению конечных продуктов гликирования RAGE на эндотелиальных клетках в гиппокампе, которые индуцируют отложение бета-амилоида в эндотелии церебральных микрососудов, что в свою очередь вызывает церебральные сосудистые нарушения, наблюдаемые при развитии болезни Альцгеймера.

Результаты исследований по оценке роли RAGE-опосредованных механизмов в регуляции проницаемости ГЭБ и ангиогенеза в норме и при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro* опубликованы в статье «Оценка уровня RAGE в клетках гематоэнцефалического барьера при экспериментальной болезни Альцгеймера»¹⁰

¹⁰ Горина Я.В. и [и др.]. Оценка уровня RAGE в клетках гематоэнцефалического барьера при экспериментальной болезни Альцгеймера // Цитология. 2021. №2(63). С.176-183.

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

Пластичность мозга, которая подразумевает способность претерпевать структурные и функциональные изменения в ответ на раздражители окружающей среды, тонко модулируется диетой и гормонами, включая инсулин [511]. Соответственно, изменение передачи сигналов инсулина в ЦНС может ускорять старение мозга, влиять на нейрональную пластичность мозга и способствовать развитию нейродегенерации [448].

Ранее нами было выявлено нарушение экспрессии молекул-компонентов инсулин-сигнального пути, в частности, GSK-3 β , который в физиологических концентрациях регулирует пролиферацию и нейропластичность нервных клеток-предшественников, тогда как его активация вызывает гиперфосфорилирование тау-белка – одного из ключевых триггеров патогенеза болезни Альцгеймера [671]. Также мы продемонстрировали, что развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированное с нарушением инсулин-сигнализации, сопровождается церебральным дисметаболизмом глюкозы, которая, как известно, является основным источником энергии, используемой нервными клетками для активации, биосинтеза нейротрансмиттеров [204] и генерации постсинаптических потенциалов [348].

Поэтому логичным продолжением экспериментального исследования явилось изучение влияния локальной инсулинорезистентности на экспрессию γ H2AX – маркера двуцепочечных разрывов ДНК, возникающих в нейронах с активированной транскрипцией генов немедленного раннего ответа (например, c-fos), а также исследование влияния бета-амилоида и инсулина на синаптическую передачу в гиппокампе и миндалевидном теле – областях головного мозга, играющих ключевую роль в обучении и памяти и

претерпевающих значительные патологические изменения при болезни Альцгеймера.

3.5.1 Экспрессия γ H2AX в нейронах гиппокампа у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера

Как известно, при нейродегенеративных заболеваниях наблюдаются выраженные нарушения целостности генома из-за увеличения уровня повреждения ДНК, что является причиной дисфункции и гибели нейронов [537, 808]. Примечательно, что повышенные уровни повреждения ДНК в стареющем мозге связаны со сниженной экспрессией основных генов, включая гены, участвующие в пластичности нейронов [493].

Известно, что разрыв двуцепочечной ДНК запускает фосфорилирование Ser139, что приводит к образованию фосфорилированного H2AX, называемого γ H2AX [423].

Поэтому мы изучили экспрессию нейронами фосфорилированной формы гистона H2AX как у животных в условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида (у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера – C57BL/6+A β 1-42), так и при прогрессировании хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа (у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера).

При изучении аккумуляции в нейронах гиппокампа γ H2AX нами выявлен статистически значимо ($P < 0,001$) высокий уровень данного маркера в нейронах у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) ($28,33 \pm 1,77$) по сравнению с контрольной группой (линия C57BL/6) ($9,27 \pm 0,92$) (**рисунок 60 А, рисунок 61 В-Г**). Подобная картина наблюдалась и у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) ($10,50 \pm 1,29$) по сравнению с ложно-оперированными животными

(C57BL/6+PBS) ($6,87 \pm 1,21$) при $P=0,0443$ (рисунок 60 Б, рисунок 61 А-Б). Примечательно, что трансгенные животные с моделью болезни Альцгеймера демонстрируют максимальную аккумуляцию γH2AX в нейрональных клетках гиппокампа.

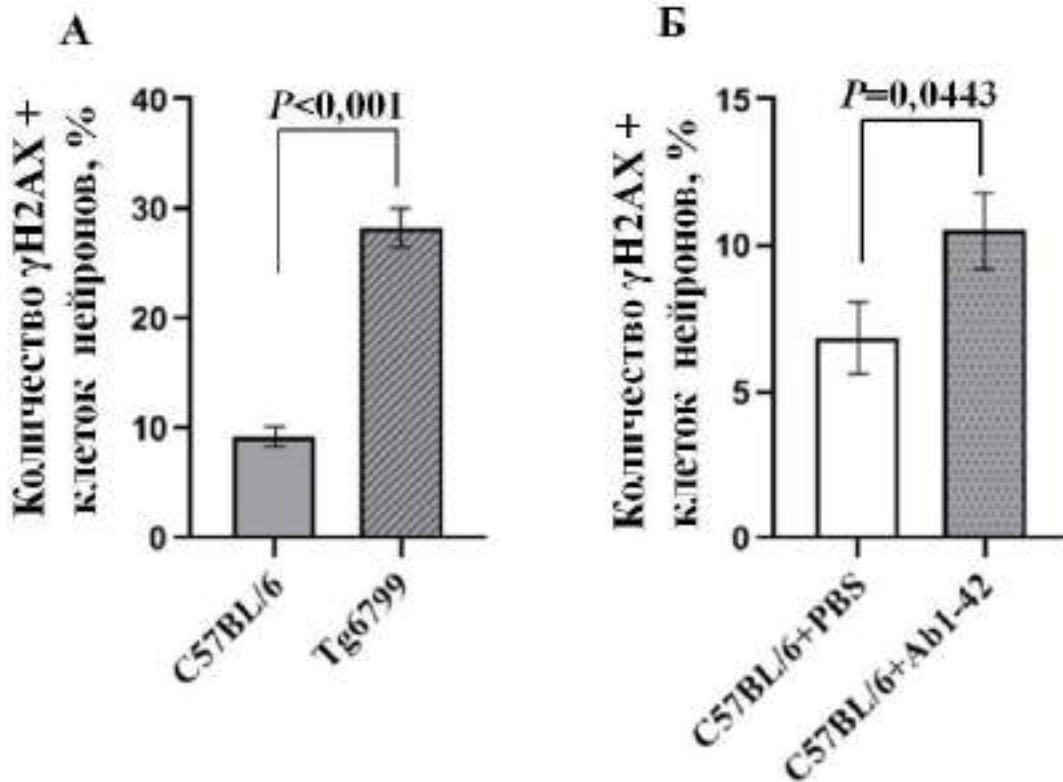


Рисунок 60 – Нарушение экспрессии γH2AX на клетках нейрональной природы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Экспрессия γH2AX в гиппокампе головного мозга: (А) у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg6799) и контрольной группы (C57BL/6) ($*P < 0,05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна-Уитни); (Б) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) ($*P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 3 поля зрения).

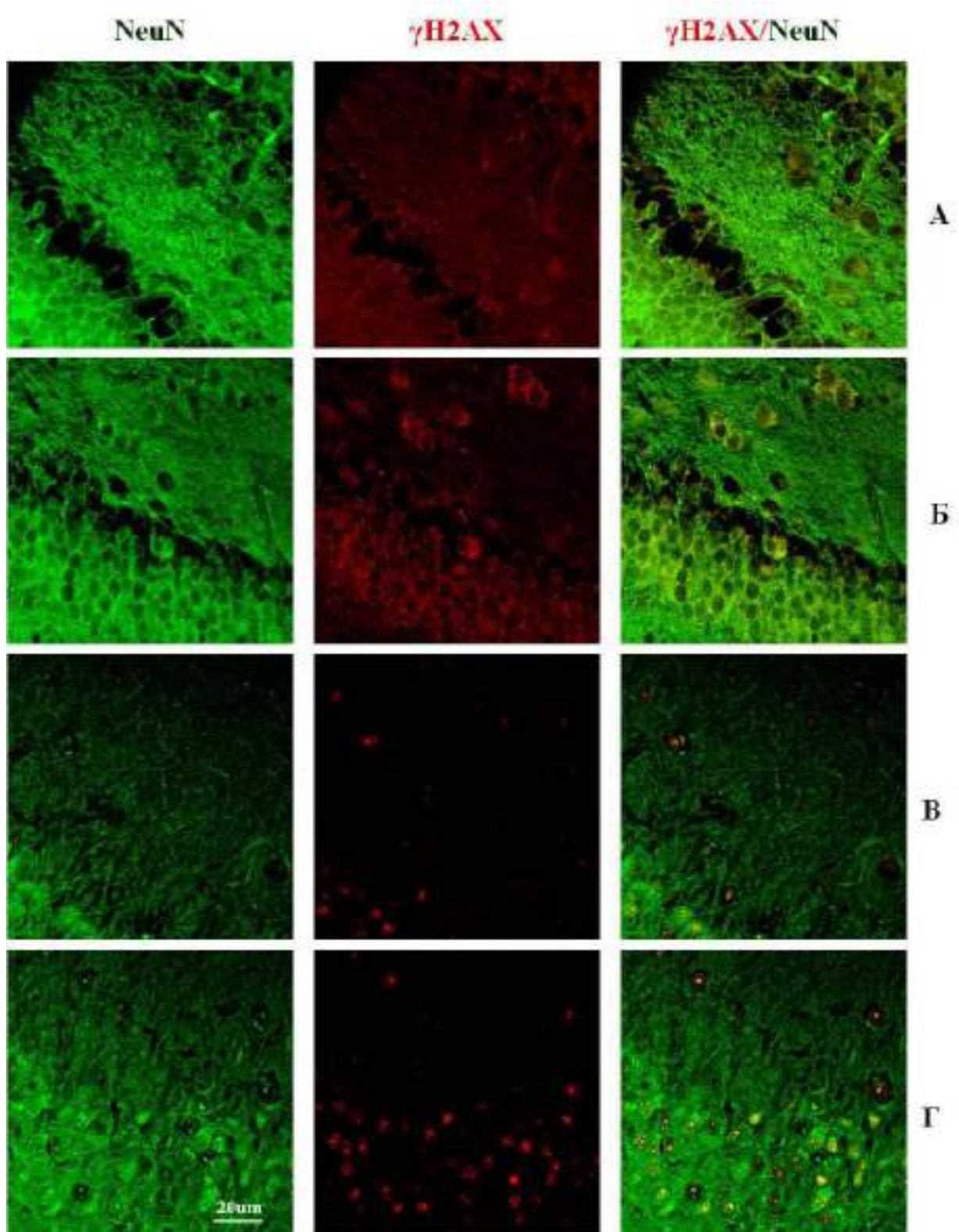


Рисунок 61 – Иммуногистохимический анализ экспрессии γ H2AX на клетках нейрональной природы в гиппокампе головного мозга животных разных экспериментальных групп

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: экспрессия γ H2AX +клеток (красный), NeuN+клеток (зеленый) в гиппокампе головного мозга в экспериментальных группах: (А) ложно-оперированные животные (C57BL/6+PBS), (Б) животные с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42), (В) контрольная группа (линия C57BL/6), (Г) животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799).

Таким образом, нейродегенерация альцгеймеровского типа в гиппокампе экспериментальных животных сопровождается аккумуляцией γ H2AX в нейронах, что свидетельствует о формировании двуцепочечных разрывов ДНК. Это регистрируется как в условиях острого нейротоксического действия бета-амилоида (у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера), так и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера).

Мы полагаем, что накопление фосфорилированной формы гистона γ H2AX является маркером прогрессирующего повреждения клеток. Поскольку двуцепочечные разрывы ДНК также могут вызывать изменения транскрипции промоторов генов, расположенных рядом с сайтами разрыва [371], тем самым приводя к изменениям синаптической пластичности, мы изучили особенности синаптической передачи в различных регионах мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера на фоне сформировавшейся локальной инсулинорезистентности.

3.5.2 Синаптическая передача в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

Нарушение регуляции синаптической пластичности лежит в основе большого числа нейродегенеративных расстройств, включая и болезнь

Альцгеймера [690]. Синаптическая дисфункция гиппокампа при нейродегенерации альцгеймеровского типа является ранним событием, приводящим к нарушению гиппокампально-зависимой памяти, при этом бета-амилоид согласно накопленным экспериментальным данным [475, 697] оказывает негативное влияние на синаптическую передачу и пластичность.

Некоторые ученые выдвинули гипотезу, согласно которой церебральный инсулин помимо участия в регуляции метаболизма глюкозы, может играть и другие важные функции, в частности, увеличивать разрастание нейритов [718] и регенерацию мелких миелиновых волокон [746], поддерживать выживание корковых, симпатических и сенсорных нейронов во время развития нервной системы [636], стимулировать синтез белка нейронов [685], улучшать синаптическую активность и пластичность [442], а также оказывать нейропротективное действие [763].

Интересно, что эти результаты, по-видимому, коррелируют с высокой экспрессией инсулиновых рецепторов в гипоталамусе и лимбической системе (гиппокамп, грушевидная кора и миндалевидное тело) [863] и могут быть связаны с хорошо известным эффектом инсулина на синаптическую передачу [108].

Выбор инъекционной модели болезни Альцгеймера для исследования влияния бета-амилоида и инсулина на синаптическую передачу в различных отделах головного мозга продиктован необходимостью сопряжения с данными по оценке продукции инсулина в ткани головного мозга.

3.5.2.1 Влияние бета-амилоида на синаптическую передачу в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

Мы исследовали основные электрофизиологические характеристики (время нарастания амплитуды, время спада амплитуды, средняя амплитуда) в виде суммарной возбудимости ограниченного количества нейронов разных зон головного мозга (пВПСП) у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS).

Так, у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера наблюдали нарушение электрических свойств пирамидных нейронов гиппокампа СА3 области, о чем указывало значимое ($P=0,0037$) увеличение времени (здесь и далее время представлено в мсек) спада амплитуд пВПСП ($2,46\pm 0,28$ против $1,76\pm 0,04$ группы с ложной операцией) и тенденция ($P=0,0694$) к увеличению времени нарастания амплитуд пВПСП ($0,68\pm 0,06$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($0,56\pm 0,02$), что может отражать замедленное высвобождение нейромедиатора из пресинапса. Кроме того, нейродегенерация альцгеймеровского типа сопровождалась нарушением возбудимости нервных клеток СА3 зоны в виде значимого ($P=0,0159$) уменьшения амплитуды пВПСП (здесь и далее амплитуда в мВ) ($0,35\pm 0,02$ против $0,48\pm 0,04$ группы с ложной операцией) (таблица 2).

При этом в СА1 области гиппокампа показатели времени нарастания и времени спада амплитуды, а также средняя амплитуда пВПСП между экспериментальными группами значимо не отличались (таблица 3).

Таблица 2 – Основные нейрофизиологические характеристики пВПСП СА3 области гиппокампа в норме и при нейродегенерации

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
Нейродегенерация	0,68±0,06	2,46±0,28	0,35±0,02
<i>P</i> (У-критерий Манна-Уитни)	0,0694	0,0037	0,0159

Таблица 3 – Основные нейрофизиологические характеристики пВПСП СА1 области гиппокампа в норме и при нейродегенерации

Группы животных	Электрофизиологические характеристики		
	Время нарастания амплитуды пВПСП, мсек	Время спада амплитуды пВПСП, мсек	Амплитуда, мВ
Ложная операция	0,81±0,05	1,85±0,13	0,49±0,03
Нейродегенерация	0,73±0,04	1,83±0,16	0,61±0,11
<i>P</i> (У-критерий Манна-Уитни)	0,2912	0,8310	0,9295

В нейронах базолатерального комплекса миндалевидного тела наблюдалось более выраженное влияние на синаптическую передачу при интрагиппокампальном введении бета-амилоида в виде изменения всех исследуемых электрофизиологических показателей (**рисунок 62**). Интересен тот факт, что действие бета-амилоида на мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера обладает нейропротективным эффектом, а именно, происходило статистически значимое ($P=0,0088$) увеличение амплитуд пВПСП нейронов миндалевидного тела ($0,88\pm 0,07$ против $0,59\pm 0,06$ группы с ложной операцией) (**рисунок 62 Г**) на фоне значимого снижения времени нарастания ($0,69\pm 0,03$ против $0,99\pm 0,05$ группы с ложной операцией при $P=0,0010$) (**рисунок 62 Б**) и времени спада амплитуд пВПСП ($1,48\pm 0,13$ против $3,28$ группы с ложной операцией при $P=0,0030$) (**рисунок 62 А-В**).

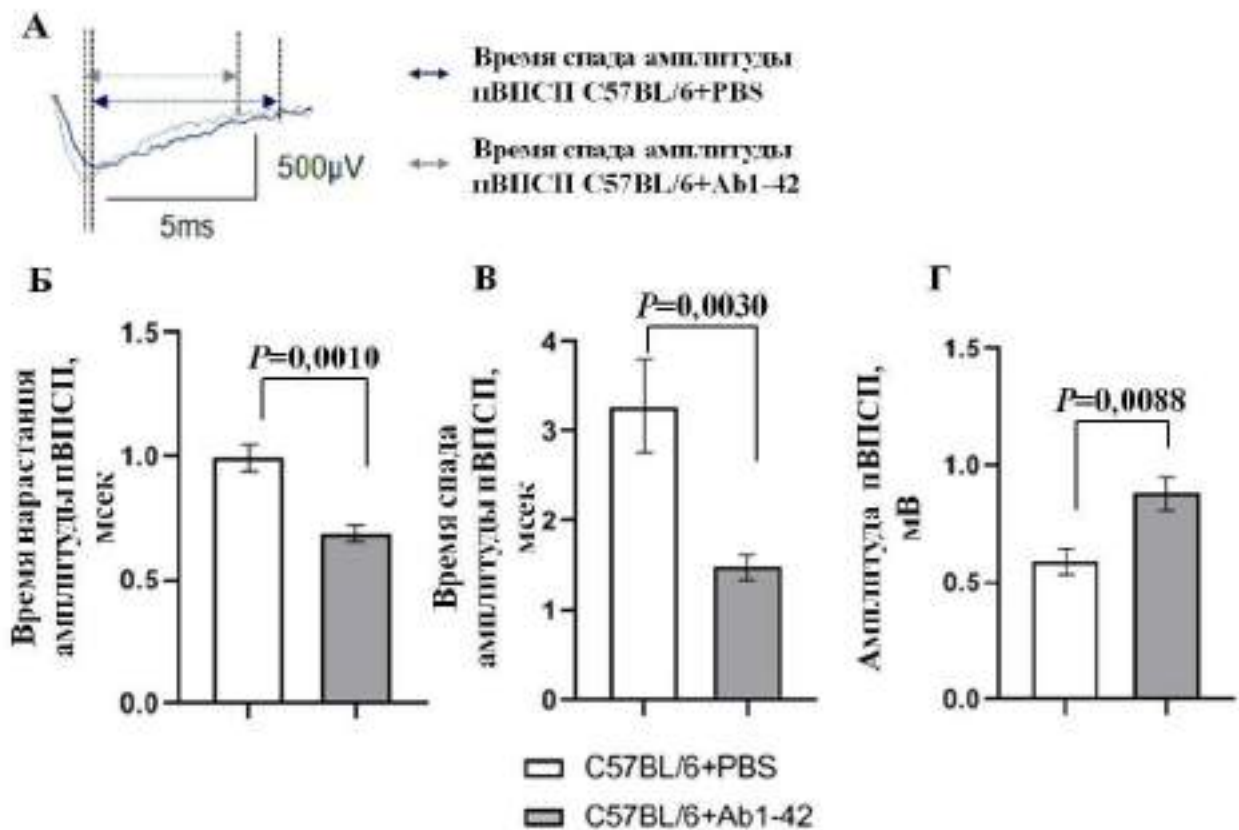


Рисунок 62 – Нарушение синаптической передачи в нейронах базолатеральной зоны миндалевидного тела при экспериментальной болезни Альцгеймера

(А) репрезентативные кривые пВПСП нейронов базолатерального комплекса миндалевидного тела, полученные от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) (кривая серого цвета) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS) (кривая синего цвета); (Б) Сводная диаграмма времени нарастания амплитуд пВПСП нейронов базолатерального комплекса миндалевидного тела; (В) Сводная диаграмма времени спада амплитуд пВПСП нейронов базолатерального комплекса миндалевидного тела; (Г) Сводная диаграмма амплитуд пВПСП нейронов базолатерального комплекса миндалевидного тела. (* $P < 0,05$ – сравнение с ложно-оперированными животными, U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$, $n=5$.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об умеренном нарушении синаптической передачи нейронов в СА3 области гиппокампа у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера, что может быть связано с уменьшением возбудимости нейронов СА3 области гиппокампа и замедленным высвобождением нейромедиатора из пресинапса в синаптическую щель. Неожиданным образом, бета-амилоид оказывал позитивный эффект на синаптическую передачу нейронов базолатерального комплекса миндалевидного тела в виде увеличения возбудимости и ускорения высвобождения нейромедиатора в синаптическую щель в синапсах.

3.5.2.2 Влияние инсулина на синаптическую передачу в различных отделах головного мозга в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера

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. В частности, пирамидные нейроны CA1 области гиппокампа реагировали значительным снижением амплитуд пВПСП непосредственно после введения 500нМ инсулина, по сравнению с нейронами базолатерального комплекса миндалевидного тела на 5-й мин исследования (**рисунок 63 А-Б**). 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 невилированием 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 63 В**).

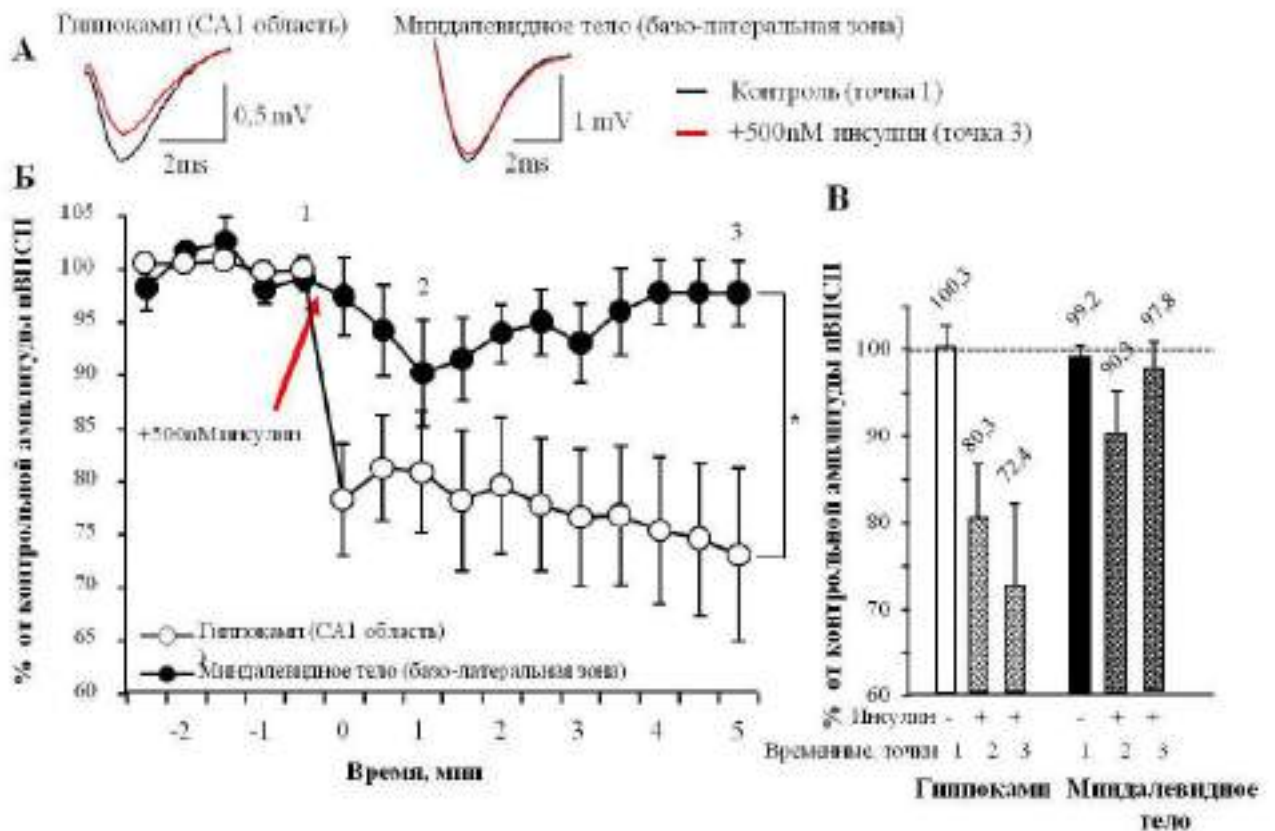


Рисунок 63 – Влияние инсулина на нейроны СА1 области гиппокампа и базолатеральной зоны миндалевидного тела в норме при его острой аппликации в концентрации 500 нМ на живой срез

(А) Репрезентативные кривые пВПСП нейронов СА1 области гиппокампа и базо-латеральной зоны миндалевидного тела, полученные от ложно-оперированных животных (C57BL/6T+PBS). Показаны чёрные кривые в зоне непосредственно перед добавлением инсулина (контроль в точке 1) и красные кривые спустя 5 мин после добавления 500нМ инсулина (в точке 3).

(Б) Сводный график усреднённых амплитуд (за каждые полминуты) нормированных к средней контрольной амплитуде пВПСП (до введения инсулина). Время однократного введения 500 нМ инсулина показано красной стрелкой. Количество исследованных зон (n=6) и количество животных (n=5).

(В) Сводная диаграмма нормированных к контролю усреднённых амплитуд пВПСП нейронов СА1 области гиппокампа и базо-латеральной зоны миндалевидного тела, полученных от ложно-оперированных животных (C57BL/6T+PBS), во временных точках 1, 2 и 3 (см. график Б). Данные найдены с помощью непараметрического дисперсионного анализа (критерий Краскелла-Уоллиса) ($F_{(5,24)}=410,8, P<0,0001$). Данные представлены в виде $\text{Mean}\pm\text{S.E.M.}$

Исследование эффектов инсулина на нейроны базо-латеральной зоны миндалевидного тела проходило более детально – с созданием инъекционной модели болезни Альцгеймера при введении интрагиппокампаально 1мкл бета-амилоида. Учитывая маловыраженное влияние на синаптическую передачу нейронов миндалевидного тела, был применён метод линейной регрессии для выявления статистически значимого влияния инсулина (**рисунок 64 Г**).

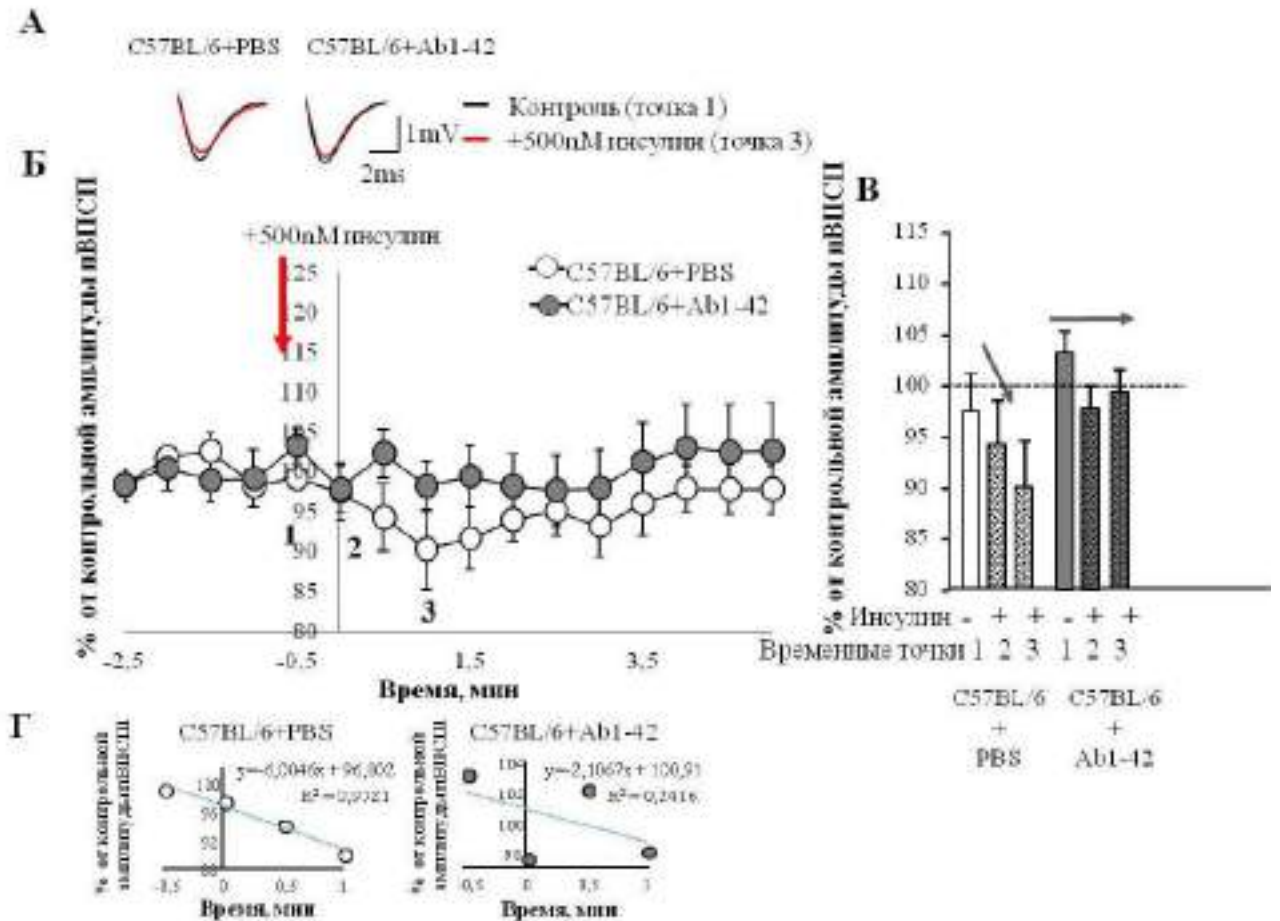


Рисунок 64 – Нарушение действия инсулина в виде изменения синаптической передачи в нейронах базо-латеральной зоны миндалевидного тела при экспериментальной болезни Альцгеймера

(А) Репрезентативные кривые пВПСП нейронов базо-латеральной зоны, полученные от животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (C57BL/6+Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6+PBS). Показаны чёрные кривые в зоне непосредственно перед добавлением инсулина (контроль в точке 1) и красные кривые в зоне максимального эффекта после добавления 500нМ инсулина (в точке 3). (Б) Сводный график усреднённых амплитуд (за каждые полминуты) нормированных к средней контрольной амплитуде пВПСП (до введения инсулина). Время однократного введения 500 нМ инсулина показано красной стрелкой. Количество исследованных зон (n=6) и количество животных (n=5). (В) Сводная диаграмма нормированных к контролю 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 Б). 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. Данные найдены с помощью непараметрического дисперсионного анализа (критерий Краскелла-Уоллиса) ($F_{(5,54)}=78,30$, $P<0,0001$). Данные представлены в виде $\text{Mean}\pm\text{S.E.M.}$ (Г) 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.

Наиболее выраженные изменения наблюдались у ложно-оперированных животных. При добавлении 500 нМ инсулина наблюдалось динамика снижения амплитуды пВПСП в точке 2 и 3 ($97,51\pm 3,72\%$ и $90,31\pm 5,04\%$, соответственно) (**рисунок 64 А-В**). При этом у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера изменения амплитуды пВПСП носили разнонаправленный характер (**рисунок 64 Б- В**).

Статистическая значимость нарастания/убывания амплитуд была определена методом линейной регрессии, был определён коэффициент регрессии (**рисунок 64 Г**), коэффициент изменения амплитуд пВПСП, а также статистическая значимость изменений в виде P -значения (**таблица 4**).

Таблица 4 – Сводная таблица показателей динамики амплитуд пВПСП нейронов базо-латеральной зоны миндалевидного тела в ответ на острое однократное введение *in vitro* 500нМ инсулина

Группы животных	Slope (%пВПСП/мин)	Доверительный интервал	<i>P</i> (критерий Уилкоксона)
Ложная операция	-7,55±2,84	-9,1;-2,9	0,0109
Нейродегенерация	-2,06±3,02	-13,5;9,3	0,5080
<i>P</i> (U-критерий Манна-Уитни)	0,1117	-	-

Данные (за 1 мин – см. точки 1 и 3 на рисунке 48) найдены с помощью метода линейной регрессии. Slope (%пВПСП/мин) – коэффициент зависимости угла нарастания/убывания кривой нормированных амплитуд, выраженных в % от контроля, от времени (%пВПСП/мин). Доверительный интервал показывает поле значений нормированных амплитуд пВПСП, в котором они находятся с вероятностью 95%. *P*-значение показывает статистически верное влияние инсулина на динамику пВПСП в виде нарастания/уменьшения нормированных амплитуд пВПСП, если *P*-значение меньше или равно 0,05. *P*-значение между группами было найдено с помощью U-критерий Манна-Уитни, *P*-значение внутри каждой группы – с помощью критерия Уилкоксона.

Так, у ложно-оперированных животных было выявлено значимое изменение коэффициента зависимости угла нарастания/убывания кривой амплитуд пВПСП от времени, тогда как при моделировании болезни Альцгеймера (в условиях острого токсического действия бета-амилоида) таких выраженных изменений не наблюдалось (**таблица 4**). При этом бета-амилоид нарушает паттерн изменения пВПСП амплитуд нейронов миндалевидного тела – амплитуды изменяются во времени разнонаправленно с незначительными

отклонениями от контрольных значений (100%), более того, статистическая значимость их изменения во времени не подтверждается (**рисунок 64 В-Г; таблица 4**).

Таким образом, наши данные свидетельствуют о различной чувствительности нейронов к инсулину в СА1 области гиппокампа и базолатеральной зоне миндалевидного тела. В физиологических условиях (у ложнооперированных животных) действие инсулина проявляется уменьшением возбудимости нейронов в виде сокращения пВПСП. Тогда как при моделировании нейродегенерации бета-амилоид нарушает этот паттерн, нивелируя эффекты инсулина.

Результаты исследования влияния бета-амилоида и инсулина на синаптическую передачу в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера опубликованы в статье «NLRP3 inflammasome blocking as a potential treatment of central insulin resistance in early-stage Alzheimer»¹¹

В целом нами установлено, что развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа (как в условиях острого токсического действия бета-амилоида, так и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга) сопровождается нарушением инсулин-сигнальной трансдукции (патологическое изменение уровня ключевых молекул-компонентов инсулин-сигнального пути), что протекает совместно с развитием церебрального дисметаболизма глюкозы. Это в свою очередь находит свое отражение в нарушении экспрессии γ H2AX – маркера двуцепочечных разрывов ДНК, возникающих в нейронах с активированной транскрипцией генов немедленного раннего ответа (например, c-fos).

В условиях острого токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель болезни Альцгеймера) нейрональная аккумуляция γ H2AX

¹¹ Komleva Y.K. [et al.]. NLRP3 inflammasome blocking as a potential treatment of central insulin resistance in early-stage Alzheimer // International Journal of Molecular Sciences. 2021. №21(22). P.1-26.

обуславливает возникновение и развитие aberrантной синаптической передачи нейронов гиппокампа за счет уменьшения возбудимости нейронов и замедленным высвобождением нейромедиатора из пресинапса в синаптическую щель. При этом интересен и удивителен тот факт, что при интрагиппокампальном введении бета-амилоида 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.

Необходимо отметить и выявленное 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 при моделировании нейродегенерации (в условиях острого токсического действия бета-амилоида) влияние инсулина полностью нивелировалось под воздействием бета-амилоида.

Поскольку синаптическая пластичность считается нейронной основой процесса обучения и памяти, поэтому выявленное нами нарушение синаптической передачи при развитии болезни Альцгеймера, ассоциированное с локальной инсулинорезистентностью, является надежным индикатором и потенциальным фактором ускоренного снижения когнитивных функций.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно полученным нами результатам при развитии и прогрессировании нейродегенерации альцгеймеровского типа наблюдается аберрантная экспрессия ключевых молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции, а также патологические изменения уровней инсулина и лактата в ткани головного мозга, тем самым вызывая развитие церебрального дисметаболизма глюкозы, которое в свою очередь запускает процесс накопления конечных продуктов гликирования RAGE в эндотелии гиппокампа, что в совокупности указывает на выраженное развитие локальной инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера. Это приводит к значительному увеличению экспрессии бета-амилоида (A β) и адапторного для APP белка Fe65 в эндотелии гиппокампа, сопряженное с выраженными церебральными микрососудистыми нарушениями, что в совокупности вызывает повышение проницаемости ГЭБ.

Кроме того, нарушение экспрессии молекул-компонентов инсулин-сигнального пути, в частности, GSK-3 β , а также церебрального метаболизма глюкозы приводит к повышению экспрессии γ H2AX – маркера двуцепочечных разрывов ДНК, возникающих в нейронах с активированной транскрипцией генов немедленного раннего ответа (например, c-fos), что находит свое отражение в развитии аберрантной синаптической передачи нейронов гиппокампа и миндалевидного тела.

В совокупности, выявленные патологические изменения послужили триггером для развития и прогрессирования нарушений сложных форм поведения и различных видов памяти у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

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

4.1.1 Оценка мРНК инсулина, уровня инсулина и лактата в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Несмотря на то, что в течение многих лет мозг считался органом, нечувствительным к инсулину, в настоящее время известно, что инсулин играет критическую роль в ЦНС, участвуя в выживании нейронов, нейропластичности, памяти и когнитивных функциях [59].

Так, в исследованиях на грызунах документально подтверждено наличие мРНК инсулина в головном мозге и высвобождение инсулина из ГАМКергических интернейронов и эпителиальных клеток сосудистого сплетения [529, 574].

Кроме того, недавние исследования показали, что периферическая инсулинорезистентность приводит к потере функции мозга, что указывает на тесную связь между метаболическими и когнитивными нарушениями, а также болезнью Альцгеймера [724].

На молекулярном уровне инсулинорезистентность развивается за счет полного или частичного ингибирования регуляции IR и субстратов инсулиновых рецепторов (IRS1 и IRS2), а также нарушения связывающей активности рецепторов инсулина [121, 295]. Функционально пониженная чувствительность мозга к инсулину может проявляться в патологическом изменении разрастания нейритов, нарушении нейро- и синаптической пластичности, высвобождении и поглощении нейротрансмиттеров [34, 240].

Эффекты инсулина на ЦНС могут быть опосредованы двумя основными инсулин-сигнальными путями: PI3K / Akt- и MAPK / Ras-путь [853]. Как показывает ряд исследований, функциональные компоненты инсулин-сигнальной трансдукции могут участвовать в поддержании гомеостаза глюкозы и энергии, а также оказывать нейропротективное значение на области головного мозга, ответственные за память, в частности, на гиппокамп [301, 841].

При этом нарушение инсулин-сигнальной трансдукции в головном мозге может как опосредованно, так и напрямую привести к развитию нейродегенерации [448].

Существуют весьма противоречивые данные относительно уровня мРНК инсулина в отделах головного мозга в физиологических условиях и при развитии нейродегенерации. Так, сообщалось, что у пациентов с болезнью Альцгеймера экспрессия мРНК инсулина в нейронах гиппокампа ниже в 4 раза, а в гипоталамусе в 2 раза по сравнению с группой контроля [143]. В другом исследовании получены противоположные данные, согласно которым у пациентов с болезнью Альцгеймера старше 65 лет наблюдается выраженное повышение уровня мРНК инсулина в ткани головного мозга [263].

На сегодняшний день имеются весьма противоречивые данные относительно уровня инсулина, в частности, уровень инсулина в спинномозговой жидкости при болезни Альцгеймера, как сообщается рядом исследований, увеличивается, уменьшается или не изменяется [167, 266, 276, 546, 552].

Так, в одном из исследований выявлено, что развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа сопровождается снижением уровня инсулина в спинномозговой жидкости и его повышением в плазме, при этом соотношение уровня инсулина в спинномозговой жидкости и плазме значительно увеличивается по мере прогрессирования заболевания [167]. В других исследованиях у пациентов с болезнью Альцгеймера обнаружена гиперинсулинемия в плазме крови, что связывали с высоким индексом массы

тела и значительно большим потреблением пищи, тем самым предполагая, что гиперинсулинемия при болезни Альцгеймера может быть обусловлена теми же факторами, что и при сахарном диабете 2 типа [634, 722].

Необходимо отметить, что экспериментальные данные, полученные в ходе многочисленных исследований посмертной ткани головного мозга при болезни Альцгеймера показали, что уровни инсулина и рецептора инсулина, а также нескольких молекул-компонентов инсулин-сигнального пути были значительно снижены [132, 487, 648, 650, 727], что может вызвать каскад патологических реакций, приводящий к нарушению уровней глюкозы, ацетилхолина, холестерина и АТФ в клетках головного мозга, а также дисфункции мембраны, накоплению бета-амилоида и гиперфосфорилированию тау-белка [351, 352].

Кроме того, патологические изменения передачи сигналов инсулина, по-видимому, не происходят одновременно в разных областях мозга, а согласно недавно опубликованным данным, имеет место прогрессивное нарушение от гиппокампа к лобной коре [82].

Выявленное нами у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера повышение экспрессии гена *insulin I* как в гиппокампе, так и миндалевидном теле, значимое ($P=0,0169$) взаимное влияние «интрагиппокампальная инъекция × область головного мозга» на уровень инсулина, а также тенденция ($P>0,05$) к увеличению уровня инсулина в миндалевидном теле головного мозга в условиях острого токсического действия бета-амилоида может быть связано с включением компенсаторных (защитных) механизмов в ответ на нейротоксическое действие бета-амилоида, а также его конкурентное связывание с рецептором инсулина.

Как известно, в процессе старения организма скорость метаболизма кислорода и глюкозы в клетках головного мозга постоянно изменяется [512], однако резкие деструктивные изменения наблюдаются при развитии нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера [349]. Снижение метаболизма глюкозы регистрируется уже на ранней стадии

развития нейродегенерации альцгеймеровского типа, когда наблюдается активация окислительного стресса и нарушение биоэнергетической функции митохондрий [840].

Кроме того, при болезни Альцгеймера повышенную концентрацию глюкозы в плазме натощак связывают с повышенным уровнем глюкозы в головном мозге, при этом последнее обусловлено выраженным снижением гликолиза и экспрессии глюкозных транспортеров [52]. Важен и тот факт, что доклинические и клинические исследования ясно показывают снижение экспрессии переносчиков глюкозы в головном мозге как в процессе старения [205], так и при болезни Альцгеймера [52], включая изменения в экспрессии ключевых ферментов, участвующих в гликолизе и окислительном фосфорилировании [107, 532, 790].

Кроме того, в литературе описано сокращение активности ключевых митохондриальных ферментных комплексов при развитии болезни Альцгеймера, например снижение активности α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса [641].

Одним очевидным объяснением наблюдаемого сокращения использования глюкозы может быть гибель нейронов, что является характерной особенностью при прогрессировании нейродегенерации альцгеймеровского типа [766]. Тем не менее, во многих исследованиях было показано снижение уровня метаболизма глюкозы в мозге до начала заболевания и гибели нервных клеток. Такие наблюдения были получены и у лиц с риском развития болезни Альцгеймера, например, у носителей APOE4. Поскольку дисметаболизм глюкозы является одним из самых ранних событий, связанных с болезнью Альцгеймера, это предполагает, что такие изменения предшествуют гибели нейронов и могут фактически способствовать развитию и прогрессированию заболевания [555].

Однако в ходе другого исследования выдвинута иная точка зрения, согласно которой при прогрессировании болезни Альцгеймера наряду с выраженной гибелью нейронов, существует ограниченное число нейронов,

устойчивых к токсическому действию бета-амилоида за счет активного поглощения глюкозы, используя при этом энергетически неэффективный метод окисления глюкозы путем гликолиза с образованием лактата, тем самым повышая свою устойчивость к апоптозу [62].

Согласно одной из гипотез, в астроцитах глюкоза окисляется с помощью аэробного гликолиза с образованием лактата в качестве промежуточного продукта метаболизма, который впоследствии используется в качестве основного источника энергии для нейронов [509]. Данные нескольких исследований свидетельствуют о том, что продукция и транспорт лактата между астроцитами и нейронами необходимы для формирования долговременной памяти [576, 751]. Лактат также был идентифицирован как новая сигнальная молекула в мозге [556], ответственная за индуцированную экспрессию генов, связанных с синаптической пластичностью [838].

В ходе одного из исследований выявлено зависимое от возраста снижение уровня лактата в лобной коре головного мозга мышей линии C57BL/6 (контрольная группа), тогда как уровень лактата у мышей линии APP / PS1 в возрасте от 3 до 12 месяцев оставался неизменными. В то же время анализ интерстициальной жидкости гиппокампа показал значительное повышение уровня лактата у мышей линии APP / PS1 в возрасте 12 месяцев. Кроме того, у мышей линии C57BL/6 было обнаружено зависящее от возраста снижение уровня ключевых аэробных ферментов гликолиза и сопутствующее повышение экспрессии транспортера лактата, что коррелировало с улучшением памяти. Интересно, что у мышей линии APP / PS1 был обнаружен противоположный эффект, а именно, повышение экспрессии ферментов, продуцирующих лактат, на фоне выраженного ухудшения памяти. Эти наблюдения в совокупности показывают, что производство лактата посредством аэробного гликолиза положительно отражается на функции памяти при физиологическом старении. Однако повышенный уровень лактата у мышей линии APP / PS1 указывает на нарушение его обработки – фактора,

который может способствовать снижению когнитивных функций при болезни Альцгеймера [315].

Также, высокий уровень лактата наблюдался и в спинномозговой жидкости у пациентов с болезнью Альцгеймера, что свидетельствует о нарушении митохондриального окислительного метаболизма в клетках головного мозга [638].

Интересно, что согласно экспериментальным данным высокий уровень лактата может быть фактором риска амилоидогенеза при болезни Альцгеймера из-за aberrантного процессинга APP, ведущего к увеличению образования бета-амилоида и агрегатов APP. При этом эффект лактата, по-видимому, обусловлен повышенными уровнями шаперонов ER Grp78 и Grp94 [829].

Более того, важное исследование показало, что региональная продукция лактата тесно связана с интерстициальными уровнями бета-амилоида, который способствует фосфорилированию IRS1 по остаткам серина, препятствуя дальнейшей передаче сигналов и приводя, в конечном итоге, к инсулинорезистентности, что устанавливает дополнительную связь между гликолитическим метаболизмом, инсулинорезистентностью и ключевым патогенным белком при болезни Альцгеймера [92, 803].

Полученные нами данные о повышении уровня лактата в гиппокампе мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера 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 инсулин-сигнальной трансдукции 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 [649], что позволит нейронам использовать лактат в качестве альтернативного энергетического субстрата в условиях, не способствующих аэробному метаболизму [510].

4.1.2 Аберрантная экспрессия молекул-компонентов инсулин-сигнального пути при экспериментальной болезни Альцгеймера

Несколько исследований демонстрируют снижение экспрессии мРНК IR, инсулиноподобного фактора роста (IGF1 и IGF2), IRS1, PI3K / Akt, а также повышение уровня GSK-3beta в посмертных мозгах пациентов с болезнью Альцгеймера [416]. Интересно, что наблюдаемые изменения коррелировали с нейropатологическими признаками болезни Альцгеймера, тем самым указывая на связь между нарушением передачи сигналов инсулина и прогрессированием заболевания [650]. Нарушение связывания с рецептором инсулина / IGF также было отмечено в спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера [334]. Также показано, что ангиотензин II способствует фосфорилированию IRS1 в Ser 616 и Ser 312 посредством активации JNK и ERK 1/2, что приводит к ингибированию индуцируемого инсулином фосфорилирования IRS1, Akt и eNOS по остаткам тирозина, тем самым блокируя сигнальный каскад реакций по PI3K / Akt-пути [621].

Интересен и тот установленный факт, что прогрессивное увеличение уровня фосфорилированных форм IRS1 по Ser 616 и Ser 636/639 наблюдается уже на стадии умеренных когнитивных нарушений. При этом их накопление, наблюдаемое у пациентов с болезнью Альцгеймера, происходит преимущественно внутри нейрофибриллярных клубков и амилоидных бляшек, что указывает на проявление ими нейротоксического эффекта, и дает возможность рассматривать в качестве потенциальных кандидатов в биомаркеры церебральной инсулинорезистентности [762].

В другом исследовании было убедительно показано, что p-panTyr-IRS1p и pSer312-IRS1 могут выступать как перспективные молекулы-маркеры нейродегенерации альцгеймеровского типа, поскольку их наличие в экзосомах плазмы крови коррелирует с развитием церебральной инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера [403]. При этом форма pSer312-IRS1 активирует

расщепление IRS1, способствуя его разрушению [604], тогда как p-panTyr-IRS1 форма индуцирует ответы, которые стимулируются инсулином [300]. Стоит отметить, что у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдался высокий уровень pSer312-IRS1, в то время как уровень формы p-panTyr-IRS1 значительно снижен при сравнении с группой контроля. Также выявлено, что повышение уровня формы p-panTyr-IRS1 коррелирует с меньшей степенью развития атрофии головного мозга, тогда как повышение уровня фосфотипа pSer312-IRS1 – с выраженной атрофией, тем самым подтверждая их защитное и разрушительное значение в патогенезе нейродегенерации альцгеймеровского типа соответственно [403].

Нами установлено, что нейродегенерация альцгеймеровского типа сопровождается выраженным снижением уровня IRS1 в клетках нейрональной природы в миндалевидном теле (как при «подостром» токсическом действии бета-амилоида – инъекционная модель, так и при его хронической аккумуляции в ткани головного мозга – генетическая модель), а также IR и IRS1 в гиппокампе (при «подостром» токсическом действии бета-амилоида – инъекционная модель), что свидетельствует о развитии локальной инсулинорезистентности в головном мозге. Это в свою очередь может способствовать запуску цепи патологических реакций, приводящей к синаптической и митохондриальной дисфункции, гибели нейронов, и в конечном итоге, прогрессированию заболевания [142].

Известно, что накопление олигомеров бета-амилоида может ингибировать автофосфорилирование IR, тем самым вызывая снижение экспрессии IR и IRS1 в дендритах нейронов гиппокампа [480, 864], что приводит к патологическим изменениям в передаче сигналов по 2 основным путям – MAPK и PI3K-Akt. Это ведет к снижению поглощения глюкозы, увеличению гибели нервных клеток и активации гиперфосфорилирования тау-белка [417].

При этом важно отметить, что в физиологических условиях именно за счет активации MAPK опосредуется митогенное, неметаболическое и

пролиферативное действие инсулина [422]. Ряд оригинальных исследований демонстрируют значимую роль MAPK-пути в гиперфосфорилировании таубелка, нарушении метаболизма бета-амилоида, регулировании процесса воспаления и инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера [80, 142]. Так, введение сублетальной концентрации бета-амилоида в культуру нейрональных клеток вызывает ингибирование как MAPK / ERK, так и PI3K / Akt-пути, приводя к повышению секреции провоспалительных цитокинов, нарушению деятельности митохондрий и гибели нейронов [773].

В другом исследовании показано, что на ранней стадии развития болезни Альцгеймера бета-амилоид проникает в митохондрии, инициируя в них производство активных форм кислорода. Это приводит к окислительному стрессу и активации JNK по MAPK-пути и транскрипционного фактора NF-κB, тем самым способствуя высвобождению провоспалительных интерлейкинов и цитокинов [48], в частности, TNF-α, которые, в конечном итоге, вызывают церебральную инсулинорезистентность [104].

Стоит отметить, что MAPK играет существенную роль в обучении и памяти [304]. Так, показано, что при инъекционном введении рутин животным с экспериментальной болезнью Альцгеймера наблюдается активация MAPK-пути, ингибирование оксидативного стресса и повышение антиоксидантной активности, способствуя снижению нейротоксического эффекта бета-амилоида, что проявляется в выраженном улучшении памяти [545].

В другом исследовании сообщалось, что применение сублетальных концентраций бета-амилоида к нейронам в культуре клеток препятствует BDNF-индуцированной активации ERK и фосфорилированию CREB – основного регулятора выживания клеток и экспрессии генов, связанных с синаптической пластичностью [774], что, в конечном итоге, может негативно отражаться на реализации когнитивных функций [782].

В ходе проведения исследований нами установлено снижение уровня экспрессии MAPK на клетках нейрональной природы в миндалевидном теле головного мозга у животных при моделировании нейродегенерации

альцгеймеровского типа (как при «подостром» токсическом действии бета-амилоида, так и при его хронической аккумуляции в ткани головного мозга). Это может быть вызвано патологическими церебральными изменениями инсулин-сигнальных механизмов, реализуемых по MAPK-пути, что находит свое отражение в нарушении пролиферации, дифференцировки и выживании нейронов, приводя, в конечном итоге, к деструктивным изменениям процесса обучения и памяти [855].

С другой стороны известно, что нарушение передачи сигналов инсулина приводит к снижению активности PI3K, тем самым снижая активность Akt, которая необходима для выживания, пластичности и метаболизма нейронов, а дальнейшее повышение активности GSK3-alpha/beta способствует фосфорилированию тау-белка и накоплению бета-амилоида [727].

Так, установлено, что GSK3-beta наиболее значительно экспрессируется в тканях головного мозга, а именно, в нейронах, вместе с тем экспрессия GSK3-beta заметно выше в тканях развивающегося мозга, нежели в тканях головного мозга взрослого человека [824].

Важно и то, что GSK3-beta представляет собой одну из наиболее значимых фосфорилированных киназ, которая играет важную роль как в стабилизации микротрубочек и регуляции концентрации фосфорилированного тау-белка [147], так и в увеличении роста аксонов, особенно в развивающемся головном мозге [757].

На сегодняшний день в литературе существуют диаметрально противоположные точки зрения относительно того, каким образом меняется уровень экспрессии GSK3-beta в головном мозге при развитии хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа. Так, известно, что GSK3-beta является тем ферментом, который непосредственно участвует в фосфорилировании тау-белка, и как установлено, нарушение в передаче сигналов с участием PI3K способствует снижению сигнальной трансдукции Akt, что в результате приводит к патологическим изменениям в регуляции активности GSK3-beta. В свою очередь, этот каскад патологических событий

вызывает гиперфосфорилирование тау-белка [454], нарушение синаптической пластичности, дисфункцию нейрональных клеток, и, в конечном итоге, способствует прогрессированию болезни Альцгеймера [331].

Однако в ходе другого исследования [779] получены противоположные данные, согласно которым олигомеры бета-амилоида не подавляют, а активируют передачу сигналов по пути PI3K–Akt– mTOR в ткани нижней теменной доли головного мозга как на стадии умеренных когнитивных нарушений, так и при прогрессировании болезни Альцгеймера.

Также необходимо отметить, что при развитии болезни Альцгеймера наблюдалось выраженное снижение уровня GSK3-beta в ткани головного мозга по сравнению с группой контроля. При этом уровень экспрессии формы GSK3-beta, фосфорилированной по Ser9, восстанавливался, тогда как экспрессия GSK3-beta, фосфорилированной по Tyr216, заметно повышалась. Ведь как установлено, фосфорилирование GSK3-beta по остаткам Tyr216 или Ser9 может усиливать или ослаблять активность GSK3-beta, соответственно [290]. Таким образом, согласно экспериментальным данным ряда авторов, выдвинутое предложение том, что гиперэкспрессия GSK3-beta вызывает гиперфосфорилирование тау-белка, не является в полной мере доказанным, а те подходы к лечению заболевания, которые основаны на ингибировании GSK3-beta, показали выраженную невысокую клиническую эффективность [252].

Наряду с этим, результаты нескольких исследований демонстрируют, что уровень экспрессии GSK3-beta значительно выше у пациентов с СД 2 типа в сочетании с умеренным когнитивным дефицитом, нежели у пациентов с СД 2 типа без когнитивных нарушений, что свидетельствует о том, что гиперэкспрессия GSK3-beta может являться показателем когнитивной дисфункции при развитии СД 2 типа [517, 832].

Данные *in vitro* и *in vivo* показали, что активация GSK3-beta напрямую связана с образованием и накоплением бета-амилоида в головном мозге при болезни Альцгеймера [366, 714]. Показано, что APP и PSEN1, а также один из каталитических компонентов комплекса γ -секретазы выступают в качестве

субстратов GSK3-beta, тем самым предполагая, что на расщепление APP и функцию PSEN1 влияет активация GSK3-beta, что в свою очередь способствует интенсивной продукции бета-амилоида и его последующему отложению. В частности, гиперэкспрессия GSK3-beta может снижать активность комплекса PSEN1/N-кадгерин/бета-катенин, вызывая нарушение синаптической пластичности и нейрональную дисфункцию [120].

Более того, GSK3-beta может инициировать образование амилоидных бляшек за счет гиперактивации β -секретазы (BACE1) при участии NF- κ B, который регулирует GSK3-beta-индуцированную транскрипцию BACE1, вызывая гиперпродукцию бета-амилоида [497].

Помимо прямого воздействия на APP, повышение уровня GSK3-beta может вызывать аккумуляцию бета-амилоида посредством нарушения передачи сигналов инсулина. Исследования *in vivo*, проведенные с использованием мышей с моделью СД 2 типа, выявили положительную корреляцию между уровнями бета-амилоида и GSK3-beta. Кроме того, было установлено, что низкий уровень инсулин-разрушающего фермента, который регулирует клиренс бета-амилоида, связан с повышением активности GSK3-beta [387].

Установленная нами повышенная экспрессия GSK3-beta в клетках нейрональной природы миндалевидного тела головного мозга животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера (как при «подостром» токсическом действии бета-амилоида – инъекционная модель, так и при его хронической аккумуляции в ткани головного мозга – генетическая модель) может быть следствием патологических изменений в передаче сигналов инсулина в ткани головного мозга, которая реализуется по I3K-пути [860]. Это в свою очередь вызывает ингибирование пролиферации клеток, синаптическую дисфункцию, нарушение выживания нейрональных клеток и апоптоз, что, в конечном итоге, негативно влияет на процессы обучения и запоминания [363].

Как известно, патофизиологические процессы, которые вовлечены в развитие или прогрессирование хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа, регулируются несколькими ключевыми сигнальными

путями, одним из которых является РКС-путь. Примечательно, что РКС называют «киназой памяти», что обусловлено ее существенным вкладом в формирование памяти не только в нормальных, но и в патологических состояниях, в частности, при развитии болезни Альцгеймера [494]. Так, установлено, что РКС принимает участие в активации синтеза белков, синаптическом ремоделировании и ряде других значимых процессах, необходимых для обучения, формирования и развития памяти. Кроме того, активация РКС в нейронах головного мозга играет значимую роль на всех этапах процесса обучения, а именно, на этапах приобретения, консолидации и реконсолидации памяти [573].

Несколько экспериментальных исследований продемонстрировали, что усиление активности РКС способствует как повышению продукции нейропротективного растворимого белка-предшественника бета-амилоида sAPP α , так и уменьшению концентрации нейротоксичных форм бета-амилоида *in vitro* и *in vivo* [43]. Также стоит отметить, что РКС защищает клетки нейрональной природы от агрессивного цитотоксического действия бета-амилоида [270], ровно как и ингибирует гиперфосфорилирование тау-белка через фосфорилирование и инактивацию GSK3-beta [373]. Примечателен и тот установленный факт, что у пациентов с болезнью Альцгеймера активатор РКС – бриостатин в субнанолярных концентрациях резко усиливал секрецию фибробластами α -секретазы, которая расщепляет APP с образованием sAPP α . При этом у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера бриостатин не только эффективно снижал уровень олигомеров бета-амилоида Ab1-40 и Ab1-42, но и уменьшал частоту преждевременной смерти, а также оказывал положительное влияние на поведение. Здесь же показано, что другой активатор РКС – бензолактам значительно увеличивал концентрацию sAPP α и уменьшал уровень одного из олигомеров бета-амилоида – Ab1-40 в головном мозге мышей с трансгенной моделью болезни Альцгеймера [39].

Выявлено, что РКС принимает непосредственное участие в фосфорилировании IRS1 по остатку Ser24, что необходимо для согласованной

передачи сигналов инсулина [572]. При этом IRS1 активирует белки, содержащие домены Src-homology-2 (SH2), что индуцирует синтез белка и гликогена, поглощение глюкозы, а также вызывает ингибирование глюконеогенеза [765]. В дополнение к этому установлено, что как РКС, так и инсулин активируют одни и те же сигнальные пути посредством ERK1/2 MAP и через стимуляцию киназы src [223].

Результаты нескольких исследований убедительно доказывают, что активация РКС-пути играет важное значение в синаптогенезе, который лежит в основе процесса обучения и памяти. Наряду с этим, РКС-путь взаимосвязан с инсулин-сигнальным путем, который, как известно, также принимает участие не только в синаптогенезе, но и регуляции процесса обучения и формировании и развитии различных видов памяти [345].

В целом, можно утверждать, что при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа (в условиях острого токсического действия бета-амилоида – инъекционная модель, так и при его хронической аккумуляции в ткани головного мозга – генетическая модель) наблюдаются выраженные нарушения экспрессии IR и IRS1, что ассоциировано с деструктивными изменениями в передаче сигналов по MAPK- и РКС-пути, тем самым свидетельствуя о развитии церебральной резистентности к инсулину.

4.1.3 Оценка мембранного потенциала митохондрий головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Митохондриям чаще всего отводят фундаментальную роль центра энергетического метаболизма, в котором генерируется большая часть АТФ, которая далее используется клетками живого организма. Данная функция является одной из ключевых, однако в последние годы ученые акцентируют все

большее внимание на участии этих органелл в регуляции иных клеточных функций и межклеточной коммуникации.

В связи с достаточно высокой потребностью нейронов в АТФ головной мозг гораздо более уязвим к митохондриальной дисфункции относительно других органов [701]. Примечателен тот факт, что функцию митохондрий можно оценить, отслеживая изменения в потенциале митохондриальной мембраны [667]. При этом положительный митохондриальный мембранный потенциал является основой для нормальной работы и выживания клеток, особенно тех, которые имеют высокую потребность в энергии. Таким образом, снижение данного показателя может служить индикатором повреждения клеток [811]. Так, Abeti R. и соавторы показали, что мышинные модели с атаксией Фридрейха демонстрируют снижение мембранного потенциала митохондрий, что вызвано дисбалансом активности между комплексами I и II в цепи переноса электронов [28].

В ходе исследований нами выявлено значимое повышение мембранного потенциала митохондрий у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера. Такое, на первый взгляд, парадоксальное увеличение аккумуляции JC-1 в митохондриях клеток в условиях острого токсического действия бета-амилоида имеет свое объяснение. Одна из возможных причин – регистрация начальных стадий апоптоза клеток, при которых обычно регистрируется гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны [607], причем такие события могут сохраняться в клетках достаточно долго (до нескольких часов) [438].

Иным логичным объяснением является возможность регистрации гиперполяризации митохондрий, приводящей к аккумуляции агрегатов JC-1, вследствие локального дисметаболизма глюкозы, что обычно характерно для нейродегенерации альцгеймеровского типа, в том числе в сочетании с окислительным стрессом [555]. Так, ранее было показано, что ответной реакцией астроцитов на депривацию глюкозы и кислорода является гиперполяризация митохондриальной мембраны [438], причем aberrantный

метаболизм глюкозы играет в этом механизме доминирующую роль. По аналогии с этими данными, мы можем предположить, что развивающаяся локальная инсулинорезистентность в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера в примененной нами инъекционной модели, как это было показано нами ранее, приводит к дисметаболизму глюкозы, что способствует гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны.

Более того, изменения мембранного митохондриального потенциала сопровождаются слиянием и разделением митохондрий: вновь образующиеся после разделения митохондрии могут быть как деполяризованными, так и гиперполяризованными, причем гиперполяризованные «дочерние» митохондрии имеют гораздо большую способность к слиянию после первичного разделения (деполяризация внутренней мембраны митохондрий подавляет слияние этих органелл) [467, 786]. В таком случае, разделение митохондрий и накопление гиперполяризованных митохондрий с тенденцией к повторному слиянию можно рассматривать как «адаптационный механизм», способствующий усиленной митохондриальной динамике в условиях повреждения нервной клетки. Эта гипотеза интересна и потому, что она может объяснить появление феномена MOAS-митохондрий в клетках при болезни Альцгеймера, а именно, фрагментированные митохондрии имеют заведомо низкий потенциал, тогда как гиперполяризованные митохондрии, образующиеся вследствие фрагментации и имеющие тенденцию к слиянию, могут быть ответственны за образование удлиненных митохондрий. Однако данная гипотеза нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

Информация о нарушении митохондриального энергетического метаболизма при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях неоднократно обсуждалась в научной литературе [515, 521, 637].

Применительно к нейродегенерации альцгеймеровского типа, некоторыми авторами было высказано предположение о том, что растворимые или нерастворимые формы бета-амилоида нарушают производство АТФ, тем

самым вызывая дефекты в митохондриальном энергетическом метаболизме и окислительный стресс [87, 185], а измененные уровни ферментов окислительного фосфорилирования непосредственно ответственны за снижение производства энергии в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [85] .

На основании данных патологоанатомических исследований тканей мозга пациентов, а также различных моделей мышей с болезнью Альцгеймера – поврежденные митохондрии и повышенный окислительный стресс являются общими чертами этого заболевания [478, 528]. Кроме того, исследования показывают, что при болезни Альцгеймера происходит накопление поврежденных митохондрий, вызванное дефектной митофагией [180, 234].

Стоит отметить, что Ну У. и соавторы [358] выявили новый механизм, лежащий в основе нейрональной токсичности тау-белка, гиперфосфорилированные формы которого маркируют нейродегенерацию альцгеймеровского типа. В частности, результаты исследования продемонстрировали, что внутриклеточное накопление полноразмерного тау-белка дикого типа человека, которое наблюдается в головном мозге при спорадической болезни Альцгеймера, вызывает дефицит митофагии, с механизмами, включающими прямое внедрение тау-белка во фракции внешней мембраны митохондрий, увеличивая впоследствии митохондриальный мембранный потенциал.

Таким образом, нейродегенерация альцгеймеровского типа (инъекционная модель заболевания) сопровождается развитием нарушения митохондриального окислительного метаболизма в клетках головного мозга, которая может быть спровоцирована токсическим действием бета-амилоида, а также локальным дисметаболизмом глюкозы, тем самым вызывая гиперполяризацию митохондриальной мембраны, и как следствие, митохондриальную дисфункцию.

4.1.4 Влияние резистентности головного мозга к инсулину на нарушение метаболизма глюкозы при экспериментальной болезни Альцгеймера

Как показано в ходе проведения многочисленных исследований, сфокусированных на детальном изучении механизмов нарушения церебрального метаболизма глюкозы при развитии нейродегенерации, снижение нейронального захвата глюкозы может являться ранним признаком в патогенезе болезни Альцгеймера [329, 365, 555, 641]. При этом выраженный дисметаболизм наблюдается в первую очередь в теменной и височной долях, задней поясной извилине и лобной доле, мозжечке и таламусе [555].

Важно подчеркнуть, что путь передачи сигналов инсулина играет ключевую роль в регуляции трансмембранного прохождения глюкозы. Это зависит от различных медиаторов, а именно, от транспортера глюкозы GLUT4, молекул-компонентов PI3K- и MAPK-сигнального пути, а также от астроцитов, входящих в структуру ГЭБ, которые существенно способствуют поддержанию энергетического гомеостаза в головном мозге [547].

Установлено, что клетки нейрональной природы в определенных отделах головного мозга активно экспрессируют GLUT4, а именно, в гиппокампе, миндалевидном теле, мозжечке, сенсомоторной коре, гипофизе и гипоталамусе [56, 610], где данный инсулинзависимый транспортер глюкозы может быть вовлечен в реализацию когнитивных функций [391].

Активность GLUT4 в нейрональных клетках головного мозга определяет степень эффективности инсулин-опосредованной регуляции церебрального транспорта глюкозы [797]. После поглощения нервными клетками глюкоза метаболизируется по пути аэробного гликолиза до пирувата, который превращается в ацетил-коэнзим А, вступающий в цикл Кребса с последующим образованием АТФ [32].

Снижение экспрессии GLUT4, обусловленное нарушением передачи сигналов инсулина, тесно связано со снижением поглощения глюкозы нервными клетками [756].

Более того, в ходе исследования [794] взаимосвязи между развитием болезни Альцгеймера и активностью ферментов гликолиза (гексокиназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и пируваткиназы) выявлено, что в физиологических условиях передача сигналов через Wnt-путь активирует метаболизм глюкозы за счет увеличения экспрессии гексокиназы, тогда как при нейродегенерации наблюдается нарушение регуляции Wnt-сигналикации, что ассоциировано со снижением уровня ферментов гликолиза. При этом накопление такого промежуточного продукта гликолиза, как глюкозо-6-фосфата может снижать активность гексокиназы за счет конкурентного ингибирования связывания АТФ с активным центром фермента [483]. Это соотносится с результатами недавно проведенного исследования, в ходе которого выявлено накопление глюкозо-6-фосфата как у мышей с моделью болезни Альцгеймера, так и у пациентов, что, в конечном итоге, ингибирует гликолиз [194]. Гексокиназа связывается с внешней митохондриальной мембраной через потенциал-зависимый анионный канал 1 (voltage-dependent anion channel (VDAC1)), который отвечает за распространение потенциала действия, и закрывается в ответ на изменение трансмембранного митохондриального потенциала, тем самым контролируя митохондриальную проницаемость переходной поры. Кроме того, взаимодействие VDAC1 с гексокиназой может генерировать потенциал внешней мембраны в митохондриях головного мозга [316]. Установлено, что в посмертной ткани головного мозга мышей и пациентов с болезнью Альцгеймера уровни гексокиназы были снижены, тогда как уровни VDAC1 повышены [177]. При высоких значениях трансмембранного митохондриального потенциала митохондриальная дыхательная цепь становится генератором значительного количества АФК, что может фактически снизить поступление АТФ и привести к снижению энергии и митохондриальной дисфункции, вызванной окислительным стрессом [725].

Также необходимо учитывать, что нейрональная активность GLUT4 находится под контролем IRAP. Так, по результатам одного из исследований у мышей, нокаутных по IRAP, наблюдалось ярко выраженное снижение базального и стимулированного инсулином захвата глюкозы мышечной и жировой тканью [410]. Это дает возможность утверждать, что уменьшение уровня IRAP приводит к снижению экспрессии GLUT4 [389].

Кроме того, согласно результатам другого исследования IRAP играет значимую роль не только в постнатальном развитии головного мозга, но и в поддержании нормального функционального состояния гиппокампа во взрослом состоянии. Так, у мышей, дефицитных по IRAP, в возрасте 3 месяцев выявлено значительное нарушение пространственной памяти и распознавание нового объекта, но без видимых деструктивных изменений оперативной памяти [844].

Как известно, AngIV участвует в регуляции каталитической активности IRAP и GLUT4-зависимого поглощения глюкозы, что находит свое отражение в реализации процессов обучения, памяти, эмоциональных реакций и обработке сенсорной информации [374]. Согласно недавно проведенному исследованию, у пациентов с болезнью Альцгеймера выявлено снижение аминопептидаз А и N в головном мозге, принимающих непосредственное участие в синтезе AngIV, а также уменьшение уровня рецепторов AT4 [826]. Это согласуется с данными другого исследования [624], в котором продемонстрировано снижение активности аминопептидазы А у пациентов с болезнью Альцгеймера, подтверждая тот факт, что уровни AngII будут повышены за счет снижения метаболизма AngII до AngIII. Также выдвинуто предположение о снижении превращения AngIII в AngIV за счет снижения активности ферментов, регулирующих метаболизм ангиотензинов – аминопептидазы N и аминопептидазы B. Это дает возможность предполагать об участии AngII и AngIV в патогенезе болезни Альцгеймера, в частности, в нарушении регуляции активности IRAP и GLUT4-зависимого поглощения глюкозы.

Также необходимо отметить, что уменьшение уровня глюкозных транспортеров может способствовать нарушению захвата глюкозы и ее транспорта к нейронам и глиальным клеткам, что приводит к нарушению метаболизма глюкозы в головном мозге. Это в свою очередь способствует образованию конечных продуктов гликирования (AGE и RAGE), которые, как выявлено, играют важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера [485]. Так было показано, что гликирование бета-амилоида и тау-белка, стимулируемое продуктами гликирования посредством ингибирования Akt и последующей активации GSK-3 β , приводит к образованию амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, соответственно [476]. В дополнение к этому, гистологическое исследование выявило положительное окрашивание продуктов гликирования в непосредственной близости от амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков [486].

Исходя из выше изложенного можно сделать заключение, что нейродегенерация альцгеймеровского типа (при «подостром» токсическом действии бета-амилоида – инъекционная модель заболевания) сопровождается гиперэкспрессией гена инсулина как в гиппокампе, так и миндалевидном теле, что сопряжено с тенденцией повышения уровня инсулина в ткани миндалевидного тела головного мозга, а также выявлением значимого влияния фактора *интрагиппокампальная инъекция × область головного мозга* на уровень инсулина в ткани головного мозга, что в совокупности можно рассматривать как защитный механизм в ответ на токсическое действие бета-амилоида, а также его конкурентное связывание с рецептором инсулина. В свою очередь как в условиях острого токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель болезни Альцгеймера), так и при прогрессировании хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа (генетическая модель болезни Альцгеймера) происходит активация цепи патологических реакций вниз по сигнальному пути – абберрантная экспрессия молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции – IR, IRS1, MAPK, GSK3-beta и PKC (одной из мишеней Akt-киназы, активация которой инсулином способствует

транслокации GLUT4 в плазматическую мембрану), а также снижение уровня экспрессии IRAP в колоколизации с GLUT4, что снижает поглощение и использование глюкозы клетками головного мозга.

При этом развитие аберрантного метаболизма глюкозы в условиях острого действия бета-амилоида вызывает гиперполяризацию мембраны митохондрий, что может указывать о нарушении митохондриального окислительного метаболизма в клетках головного мозга, индуцированного нейротоксическим эффектом бета-амилоида. Это сопровождается повышением уровня лактата в ткани головного мозга, что объясняется включением защитного механизма, при котором лактат, выделяемый астроцитами, активно транспортируется к нейронам в ответ на бета-амилоидный апоптоз нейронов **(рисунок 65)**.

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. [350], 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 [130].

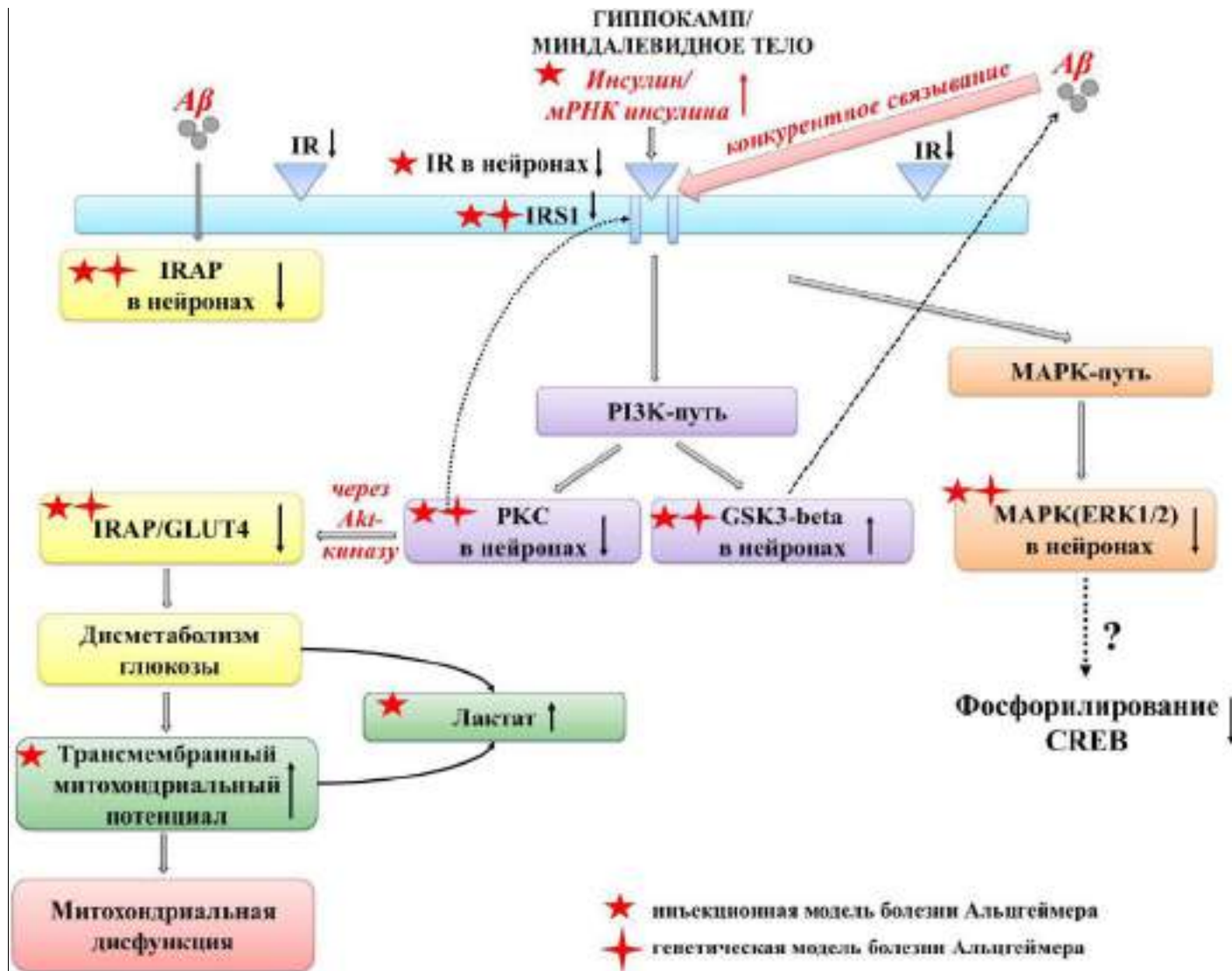


Рисунок 65 – Схема нарушения инсулин-сигнализации по PI3K- и MAPK-пути в нейронах гиппокампа и миндалевидного тела головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

4.2 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. Результаты многочисленных исследований подтвердили прямое действие инсулина на микрососудистые сегменты артериальной сосудистой сети [368].

Как известно, эндотелий церебральных сосудов экспрессирует IR и IGF1. 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 [562]. Инсулин регулирует тонус сосудов, уравновешивая эти два сигнальных пути. Продукция оксида азота снижает тонус сосудов и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, адгезию воспалительных клеток и агрегацию тромбоцитов к эндотелию, таким образом являясь ключевым фактором для нормального функционирования сосудов [407]. При высоких физиологических уровнях (например, эугликемический гиперинсулинемический зажим) инсулин также может способствовать сужению сосудов за счет активации каскада реакций по MAPK-пути, по которому реализуются эффекты стимуляции роста клеток. Этим эффектам способствует

повышенная продукция эндотелина-1 и активация ренин-ангиотензиновой системы [562].

Десенсбилизация инсулина в ткани головного мозга при развитии болезни Альцгеймера вызывает нарушение передачи сигналов инсулина и IGF1, что приводит к гибели нейронов и активации глии. Это индуцирует развитие дисфункции митохондрий, окислительного стресса и повышение уровня АФК, 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 [90, 665], что, в конечном итоге, способствует развитию церебральной амилоидной ангиопатии [408].

Установлено, что у пациентов с инсулинорезистентностью значительно ниже церебральный кровоток в коре и цереброваскулярная реактивность по сравнению с контрольной группой с нормальным гликемическим индексом, что дает возможность предполагать о том, что опосредованная инсулином функция эндотелия, вероятно, является ключевым признаком поддержания функциональной гиперемии, необходимой для сохранения нейроваскулярной единицы [661].

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 болезни Альцгеймера, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью.

4.2.1 Нарушение экспрессии CD31 в церебральных микрососудах при экспериментальной болезни Альцгеймера

Отложение бета-амилоида наблюдается не только в паренхиме головного мозга, но и в стенках церебральных кровеносных сосудов, что может способствовать эндотелиальной дисфункции, ведущей к нарушению целостности ГЭБ [789]. Это указывает на то, что, помимо нейронального дисбаланса процессинга APP, нарушение регуляции эндотелиального APP в церебральных сосудах с последующим производством цитотоксического бета-амилоида может быть важным фактором риска, который негативно влияет на нормальное функционирование мозга [297].

Многочисленные исследования показывают, что дисфункция нейроваскулярной единицы способствует возникновению и прогрессированию болезни Альцгеймера, и предполагают наличие взаимосвязи между цереброваскулярными изменениями и нейродегенерацией [665]. Отложение бета-амилоида в сосудистой сети приводит к провоспалительным и цитотоксическим событиям, которые способствуют увеличенной проницаемости в мозге при болезни Альцгеймера [226]].

PECAM-1/CD31 представляет собой белок, который играет значительную роль в адгезии [396], определяя характер взаимодействия клеток эндотелия с лейкоцитами и тромбоцитами. Снижение экспрессии CD31 в ткани головного мозга может быть интерпретировано как результат уменьшения его экспрессии при дисфункции церебрального эндотелия, а также гибели клеток эндотелия. Так, увеличение во внеклеточной жидкости уровней растворимой формы CD31 (sCD31) маркирует собой развитие эндотелиальной дисфункции, повреждения ГЭБ и развитие нейровоспаления [396]. В частности, такие наблюдения, касающиеся снижения уровня экспрессии CD31, были сделаны при болезни Альцгеймера, что позволяет предположить, что во время прогрессирования заболевания наблюдается обширная дегенерация эндотелия [285].

Кроме того, установлено, что у пациентов с болезнью Альцгеймера выявлено снижение экспрессии CD31 на фоне увеличения иммунореактивности на фибриноген, что свидетельствует о том, что церебральная амилоидная ангиопатия может быть связана с морфологическими и, возможно, физиологическими изменениями нейроваскулярной единицы и повышенной проницаемостью ГЭБ при болезни Альцгеймера [507].

В другом исследовании у пациентов с синдромом Дауна и сочетанным развитием болезни Альцгеймера было выявлено значительное снижение числа микрососудов и целостности эндотелия (оценку проводили с использованием CD31) с последующей деградацией нейронов [212], что может быть следствием ослабленной сосудистой перфузии, ведущей к ишемии и снижению активности эндотелиального трофического фактора, необходимого для поддержания целостности нейронов.

Однако одна из примененных нами моделей болезни Альцгеймера (генетическая модель с уже сформировавшимися нейродегенеративными изменениями) позволила зарегистрировать подавление неоангиогенеза, проявляющееся в снижении уровня экспрессии CD31 в CA2 и CA3 областях и зубчатой извилине гиппокампа, что приводит к формированию ГЭБ с патологической проницаемостью в данных областях головного мозга. При этом сохранение высокого уровня экспрессии CD31 в CA1 области свидетельствует о продолжающемся ремоделировании микрососудистого русла в CA1 области гиппокампа даже на фоне прогрессирования нейродегенерации и нарушения механизмов гиппокамп-зависимой памяти.

4.2.2 Аберрантный ангиогенез и проницаемость ГЭБ при экспериментальной болезни Альцгеймера

Как известно, при болезни Альцгеймера бета-амилоид накапливается в артериях головного мозга, что приводит к нарушению структуры и целостности гладкомышечных и эндотелиальных клеток, утолщению стенок сосудов, а также сужению их просвета, что, в конечном итоге, вызывает развитие церебральной амилоидной ангиопатии [652].

Недавние исследования показали, что церебральная амилоидная ангиопатия способствует развитию деструктивных нейрональных [145, 603] и синаптических изменений [848] в ключевых областях головного мозга, тем самым приводя к когнитивной дисфункции. Кроме того, при амилоидной ангиопатии наблюдаются нарушения структуры артерий и артериол среднего и малого размера, а также эндотелия капилляров, что приводит к эндотелиальной дегенерации, снижению мозгового кровотока и церебральным метаболическим изменениям [66]. Это указывает на значимую роль церебральной амилоидной ангиопатии в патогенезе болезни Альцгеймера, причем при развитии именно спорадической формы, что свидетельствует о наличии выраженной взаимосвязи между церебральной ангиопатией и деменцией [393].

Кроме того, церебральная амилоидная ангиопатия, являясь кофактором развития болезни Альцгеймера, способствует развитию когнитивной дисфункции [109], что может быть связано с ассоциированными патологиями, в частности, кровоизлиянием в мозг [289] и инфарктом [783].

Важно отметить, что прогрессирующее накопление бета-амилоида в сосудах и вокруг них вызывает изменения проницаемости ГЭБ и высвобождение медиаторов воспаления, которые нарушают кровоснабжение, что приводит к дефициту поступления кислорода и питательных веществ. Эти деструктивные изменения запускают вторичный каскад метаболических событий, включающих образование свободных радикалов и активацию

окислительного стресса, разрушение ионных каналов, высвобождение протеаз, нарушение внутриклеточного гомеостаза ионов кальция и индукцию апоптоза, таким образом усугубляя степень нарушения целостности нейроваскулярной единицы [369].

Наряду с имеющимися результатами о ключевой роли бета-амилоид-индуцированного апоптоза в нейрональной дисфункции при развитии болезни Альцгеймера [139], существуют свидетельства, которые демонстрируют активацию аналогичных бета-амилоид-опосредованных механизмов гибели эндотелиальных клеток в церебральных микрососудах [249].

Интересным является недавно установленный факт того, что патологические изменения экспрессии генов, функционально связанных с цереброваскулярными процессами, уже в раннем периоде жизни могут способствовать развитию болезни Альцгеймера у крыс линии OXYS [730].

В результате проведенных нами исследований выявлено, что при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга у животных с генетической моделью отмечаются выраженные изменения в микрососудистом русле гиппокампа, при этом наиболее аффектированной является СА1 область гиппокампа, где наблюдалось увеличение общего числа сосудов, сокращение среднего диаметра микрососудов, а также уменьшение количества ветвлений сосудистой сети. Учитывая, что именно в этой области гиппокампа мы выявили высокий уровень экспрессии CD31+ клеток логично допустить, что СА1 область и зубчатая извилина гиппокампа преобладают по процессам ремоделирования микрососудистой сети при нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Таким образом, развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа (в условиях хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга) сопровождается процессами ремоделирования микрососудистого русла, которые имеют разнонаправленный характер в тех или иных областях гиппокампа, а именно, 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.

Полученные нами данные соответствуют результатам исследования, в котором у животных с нейродегенерацией альцгеймеровского типа гиперэкспрессия бета-амилоида в головном мозге стимулирует неоангиогенез и гиперваскуляризацию, что приводит к нарушению экспрессии белков плотных контактов, тем самым способствуя нарушению целостности и увеличению проницаемости ГЭБ [97]. На уровне микрососудов головного мозга нарушение структуры эндотелиальных клеток и целостности ГЭБ может быть обусловлено гипоксией и уменьшением церебрального кровотока [116] вследствие атрофии артериол и капилляров, увеличения количества пиноцитозных пузырьков в эндотелиальных клетках, увеличения количества коллагена IV, разрушения базальной мембраны и снижения общей плотности микрососудов [395]. Кроме того, низкий уровень экспрессии маркеров эндотелия CD34 и CD31, наблюдаемый в головном мозге у пациентов с болезнью Альцгеймера, позволяет предположить, что во время прогрессирования заболевания наблюдается обширная дегенерация эндотелиальных клеток, обусловленная отложением бета-амилоида в микрососудах, что может выступать в качестве важного звена патогенеза нейродегенерации [394].

Также необходимо отметить, что снижение дренажа бета-амилоида в связи с нарушением структурно-функциональной целостности эндотелия может способствовать накоплению бета-амилоидных бляшек в паренхиме головного мозга [519].

В дополнение к этому, многочисленные сигнальные пути, а именно VEGF, PKC, RhoA / ROCK, HIF, mTOR, eNOS, AGE и miRNA могут быть вовлечены в развитие деструктивных изменений ГЭБ [74, 640, 695, 698].

В свою очередь, нарушение целостности ГЭБ вызывает гибель нейронов, активацию глиальных клеток, иммунную инфильтрацию в паренхиму, что находит свое отражение в проявлении негативных последствий в пораженных областях головного мозга, а именно, гормональный дисбаланс при поражении

гипоталамуса [378], когнитивная дисфункция при поражении гиппокампа [184], что, в конечном итоге, способствует прогрессированию болезни Альцгеймера.

Таким образом, при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа (в условиях хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга – генетическая модель заболевания) мы наблюдали в СА2 области гиппокампа значимое увеличение проницаемости ГЭБ, тогда как в СА1 области и зубчатой извилине гиппокампа это было выражено в меньшей степени. Столько выраженное повышение проницаемости ГЭБ может быть обусловлено сниженным неоангиогенезом, интенсивным ремоделированием микрососудов (уменьшение разветвленности и среднего диаметра сосудов, абберрантная экспрессия белков адгезионных контактов в клетках эндотелия) на фоне развития церебральной амилоидной ангиопатии и локальной инсулинорезистентности.

4.2.3 Нарушение экспрессии Fe65, Abeta и RAGE в клетках церебрального эндотелия при экспериментальной болезни Альцгеймера

Как известно, адапторный белок Fe65 принимает участие в разнообразных нейрональных процессах, а именно, в образовании синапсов и регуляции синаптической пластичности, нейрогенезе, миграции нейронов и разрастании нейритов, в обучении и памяти [542, 742]. Важно отметить, что интенсивность экспрессии Fe65 может изменяться не только в процессе развития организма [413], но и при возникновении ряда патологических состояниях, в частности, нейродегенерации альцгеймеровского типа [192]. Интересно, что нокаутирование гена Fe65 у мышей приводило к выраженным патологическим изменениям в структуре нейронов головного мозга, уменьшению синаптической передачи в гиппокампе, нарушению передачи нервного импульса с нервного волокна на мышечное, тревожности, снижению

пространственного обучения и памяти [742]. В то же время высокий уровень экспрессии белка Fe65 *in vitro* увеличивает транслокацию APP на клеточной поверхности, а также секрецию бета-амилоида [663].

Однако, существующие данные ряда исследований неоднозначны относительно способности белка Fe65 приводить к снижению или повышению уровня бета-амилоида. Так, Suh J. и соавторы установили, что блокирование Fe65 вызывает снижение секреции бета-амилоида в культуре нейрональных клеток [747], что согласовывалось с экспериментальными данными, полученными в ходе исследования на мышах с генетической моделью болезни Альцгеймера, нокаутированных по гену Fe65 [806]. Тем не менее, результаты другого исследования с использованием мышей линии APP / Fe65 продемонстрировали не только низкий уровень отложения бета-амилоида в коре головного мозга, но и выраженное уменьшение продукции APP [676].

Barbagallo A.P. и соавторы высказали предположение о том, что секреция бета-амилоида может находиться в прямой зависимости от взаимодействия белка Fe65 с APP, подтверждая это данными исследования с использованием APP-нокаутных мышей, которые несли ген Y682G, блокирующий связывание белка Fe65 с внутриклеточным доменом APP. У животных наблюдалось значимое уменьшение уровня бета-амилоида и выраженное повышение внеклеточного фрагмента растворимого белка-предшественника бета-амилоида sAPP α , предотвращающего генерацию бета-амилоида [81]. Полученные результаты указывают на важную роль Fe65 как адаптерного белка, который регулирует не только доставку и процессинг APP, но и генерацию бета-амилоида, занимающего центральное место в патогенезе нейродегенерации альцгеймеровского типа.

При этом остается открытым вопрос о роли Fe65 в эндотелиальных клетках. В ходе одного из исследований [792] было показано, что метаболизм APP также проходит и в церебральных эндотелиальных клетках, тем не менее, физиологическое и патофизиологическое значение продуктов протеолиза APP, как и адаптерного белка Fe65 остается до сих пор не расшифрованным.

В результате наших исследований впервые обнаружено, что нейродегенерация альцгеймеровского типа как в условиях «подострого» токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель болезни Альцгеймера), так и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (генетическая модель болезни Альцгеймера) сопровождается гиперэкспрессией белка Fe65 в клетках эндотелия гиппокампа на фоне выявленного нами повышения экспрессии бета-амилоида в эндотелиальных клетках головного мозга.

Несколько исследований последних лет демонстрируют [754, 801], что накопление бета-амилоида наблюдается как в паренхиме, так и церебральных сосудах пациентов с болезнью Альцгеймера. Это вероятно может свидетельствовать о существенном влиянии цереброваскулярных нарушений на развитие когнитивной дисфункции и, как следствие, прогрессирование нейродегенерации. Примечательно, что амилоидные бляшки в сосудах головного мозга состоят из A β 1-40 изоформы, а в паренхиме – преимущественно из A β 1-42 изоформы [535].

Токсическое влияние бета-амилоида на церебральный эндотелий было продемонстрировано как на моделях животных, так и на культивируемых клетках, а также изолированных сосудах [216, 450]. Так, выявлено, что накопление бета-амилоида в церебральной сосудистой сети как трансгенных мышей, так и пациентов с нейродегенерацией альцгеймеровского типа коррелирует с возраст-зависимым нарушением структурно-функциональной целостности эндотелия капилляров мозга [63, 317]. Также необходимо отметить, что накопление бета-амилоида приводит к сужению просвета церебральных артерий и микрососудов, тем самым способствуя снижению церебрального кровотока и, как следствие, замедлению транспорта кислорода и глюкозы к головному мозгу, что наблюдается как в случае легких когнитивных нарушений, так и при нейродегенерации альцгеймеровского типа [655, 778]. Интересен установленный в ходе исследования факт, что клетки эндотелия головного мозга животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера

обладают большей чувствительностью к дефициту кислорода и глюкозы, чем гиппокампальные нейроны. При этом последующее увеличение активности HIF-1 α (фактор, индуцируемый гипоксией 1 α) приводит к повышению генерации бета-амилоида, что, в свою очередь, способствует развитию деструктивных изменений структуры ГЭБ [114].

Также было показано, что бета-амилоид в изоформе A β 1-40 активирует стресс эндоплазматического ретикулума в церебральных эндотелиоцитах, а также митохондриально-опосредованный путь гибели клеток, который включает в себя уменьшение потенциала митохондриальной мембраны, индукцию проапоптотических факторов и транспорт ионов кальция из эндоплазматического ретикулума в митохондрии [250].

Для более глубокого понимания механизмов, которые лежат в основе нарушения функций клеток эндотелия головного мозга при нейродегенерации альцгеймеровского типа, было проведено исследование влияния A β 1-40 на транспорт ионов кальция и окислительно-восстановительный гомеостаз в церебральных микрососудах крысы. Полученные результаты показали выраженные патологические изменения концентрации ионов кальция в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и цитозоле при действии A β 1-40, что коррелировало как с увеличением активности маркеров окислительного стресса, так и нарушением функций белков, которые участвуют в регуляции гомеостаза ионов кальция на мембране эндоплазматического ретикулума [251].

В другом не менее актуальном исследовании рассматривалась роль белка RAGE как транспортера бета-амилоида в ткани головного мозга. Так, у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера взаимодействие бета-амилоида с рецептором клеток, несущих RAGE, в стенке сосуда, приводит к транспорту бета-амилоида через ГЭБ и экспрессии провоспалительных цитокинов и эндотелина-1, причем последний опосредует амилоид-индуцированную вазоконстрикцию. Однако ингибирование взаимодействия с RAGE подавляет накопление бета-амилоида в паренхиме головного мозга [187].

Стоит отметить, что гиперэкспрессия рецептора RAGE, являющегося рецептором для различных провоспалительных молекул, в частности, HMGB1, провоцирует развитие окислительного стресса и нейровоспаления [322]. Кроме того, активация AGE/RAGE- сигнального пути в головном мозге крыс индуцирует NF- κ B, регулируемый провоспалительными цитокинами, что приводит к нейровоспалению и развитию на этом фоне локальной инсулинорезистентности [484].

Важно отметить и тот факт [474], что взаимодействие бета-амилоида с RAGE на эндотелиальных клетках головного мозга запускает внутриклеточную активацию ERK, JNK и PI3K, что приводит к связыванию ядерного белка Egr-1 с промотором CCR5, тем самым способствуя экспрессии эндотелиального CCR5 (рецептор хемокинов), который играет роль в рекрутировании и накоплении микроглии в сенильных бляшках [657] и инфильтрации T-клеток в головной мозг. Это свидетельствует о том, что сигнал отложения внутримозгового бета-амилоида может передаваться системным иммунным T-клеткам с помощью RAGE, который экспрессируется эндотелиальными клетками головного мозга.

В то же время имеются экспериментальные данные, согласно которым рецептор RAGE, экспрессируясь на клетках нейрональной природы, опосредует транслокацию бета-амилоидного пептида из внеклеточного пространства во внутриклеточное [761], что дает возможность предположить о наличии реализации аналогичного механизма в эндотелиальных клетках церебральных микрососудов при аккумуляции бета-амилоида.

Таким образом, в ходе наших исследований установлено, что при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа как в условиях «подострого» токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель болезни Альцгеймера), так и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (генетическая модель болезни Альцгеймера) происходит увеличение экспрессии бета-амилоида (A β) и адапторного белка Fe65 в клетках эндотелия гиппокампа головного мозга экспериментальных животных.

Это может указывать о возможном наличии обособленных механизмов протеолиза APP в эндотелии головного мозга, которые нарушаются при развитии болезни Альцгеймера, тем самым приводя к дисфункции эндотелия, и, как следствие, нарушению структурно-функциональной целостности ГЭБ. Кроме того, гиперэкспрессия бета-амилоида (Abeta) в клетках эндотелия гиппокампа животных при хронической аккумуляции бета-амилоида (генетическая модель заболевания) сопровождается повышением уровня экспрессии белков RAGE, что, по-видимому, дополнительно способствует транспорту бета-амилоида в ткань головного мозга и аккумуляции его в гиппокампе.

4.2.4 Роль RAGE-опосредованных механизмов в регуляции проницаемости ГЭБ и ангиогенеза при экспериментальной болезни Альцгеймера *in vitro*

Двумя ключевыми кофакторами, которые способствуют развитию дисфункции церебральных сосудов при нейродегенерации альцгеймеровского типа, являются разрушение ГЭБ [203] и нарушение мозгового кровообращения (гипоперфузия) [876]. Нарушение кровообращения в головном мозге оказывает значимое влияние на проницаемость ГЭБ и концентрацию бета-амилоида. Несмотря на то, что снижение церебрального кровообращения является физиологическим процессом при старении организма, однако более серьезные нарушения были обнаружены у лиц пожилого возраста с высоким риском развития болезни Альцгеймера до начала отложения амилоидных бляшек и когнитивных нарушений [431].

Кроме того, воспалительные реакции, наблюдаемые в головном мозге при болезни Альцгеймера, могут приводить к усилению регуляции ангиогенных медиаторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), вызывая

патологический ангиогенез, посредством которого в дальнейшем может генерироваться бета-амилоид [197].

В другом исследовании была предпринята попытка изучить восстанавливающий эффект VEGF при болезни Альцгеймера *in vivo* [810], в результате было обнаружено, что внутрибрюшинная инъекция VEGF трансгенным мышам с болезнью Альцгеймера оказала выраженный положительный эффект на процессы запоминания.

Столь противоречивые результаты исследований отражают сложность этиопатологии нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Как показали исследования *in vitro*, бета-амилоид оказывает токсическое действие на эндотелиальные клетки головного мозга, поскольку он связывается с RAGE и индуцирует продукцию АФК, которые в конечном итоге разрушают белки плотных контактов и нарушают целостность ГЭБ [127]. Также было выявлено выраженное повреждение церебральных капилляров вблизи отложений бета-амилоида, сопряженное с повышенной экспрессией RAGE в микрососудах трансгенных мышей (линия 5xFAD), характеризующихся массивным накоплением бета-амилоида в головном мозге на ранних стадиях развития заболевания [437].

Помимо облегчения проникновения бета-амилоида в мозг, исследования *in vitro* показали участие RAGE в развитии сосудистых нарушений при болезни Альцгеймера, опосредуя апоптоз в головном мозге и подавляя мозговое кровообращение [187].

По результатам клинических исследований установлено, что у пациентов с болезнью Альцгеймера в микрососудах головного мозга вырабатывается повышенный уровень RAGE как в эндотелии головного мозга, так и в нейронах [539]. При этом RAGE транспортирует бета-амилоид в направлении, противоположном LRP1 (опосредует отток бета-амилоида из мозга на периферию), опосредуя повторный вход циркулирующего бета-амилоида в мозг, что способствует развитию воспаления [187].

В связи с выше сказанным, перспективным подходом для подавления притока бета-амилоида через ГЭБ и развития повреждений церебральных сосудов является использование блокаторов RAGE. Так, высокоаффинный RAGE-специфический ингибитор (FPS-ZM1) блокировал связывание бета-амилоида с V-доменом RAGE и ингибировал индуцированный Ab 1-40 и Ab 1-42 клеточный стресс в RAGE-экспрессирующих клетках *in vitro* и в мозге трансгенных мышей с болезнью Альцгеймера, что в последнем нормализовало мозговое кровообращение и оказало положительное влияние на восстановление когнитивных функций [189].

В целом, можно заключить, что нейродегенерация альцгеймеровского типа как в условиях острого токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель заболевания), так и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (генетическая модель заболевания) сопровождается нарушением инсулин-сигнальной трансдукции, которая приводит к накоплению бета-амилоида (Abeta) и гиперэкспрессии адапторного для APP белка Fe65 в эндотелии гиппокампа в головном мозге, что 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 активирует образование и отложение бета-амилоида.

При хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга (генетическая модель заболевания) 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 тех или иных областях гиппокампа), что в совокупности вызывает повышение проницаемости ГЭБ.

Кроме того, при хронической аккумуляции бета-амилоида (генетическая модель заболевания) выявленное нами нарушение церебрального метаболизма глюкозы, обусловленное патологическими изменениями инсулин-

сигнализации, приводит к накоплению рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE на эндотелиальных клетках в гиппокампе, которые индуцируют отложение бета-амилоида (Abeta) в эндотелии церебральных микрососудов *in vivo*, что в свою очередь вызывает церебральные сосудистые нарушения, наблюдаемые при развитии болезни Альцгеймера.

Моделирование болезни Альцгеймера *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 бета-амилоида 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*. Аналогичный эффект при подавлении RAGE установлен и в эндотелиоцитах от ложно-оперированных животных, что может свидетельствовать о том, что физиологический уровень экспрессии RAGE увеличивает пассивную парацеллюлярную проницаемость ГЭБ. Важно и то, что блокирование экспрессии RAGE как инструмент управления проницаемостью ГЭБ для высокомолекулярных соединений наиболее эффективно себя проявил именно при моделировании болезни Альцгеймера на фоне развития амилоидной ангиопатии, нежели в эндотелии, выделенном от ложно-оперированных животных.

Интересным является и выявленный нами факт – на фоне подавления экспрессии RAGE в церебральной эндотелии 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 болезни Альцгеймера блокирование экспрессии RAGE, а также добавление лиганда не приводит к

реализации данного эффекта, при этом исходный уровень экспрессии клеток с VEGFR2 значимо выше, чем у ложно-оперированных животных, что подтверждает наши наблюдения *in vivo* по стимуляции ангиогенеза при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Указанные церебральные сосудистые нарушения, наблюдаемые при болезни Альцгеймера *in vivo* и *in vitro*, регистрируются на фоне развития локальной инсулинорезистентности, что может свидетельствовать о дисметаболизме глюкозы в аффецированных регионах головного мозга, провоцируя гиперэкспрессию конечных продуктов гликирования RAGE на эндотелиальных клетках, что в свою очередь активирует транспорт и накопление бета-амилоида (Abeta) в эндотелии церебральных микрососудов, вызывая развитие церебральной амилоидной ангиопатии (**рисунок 66**).

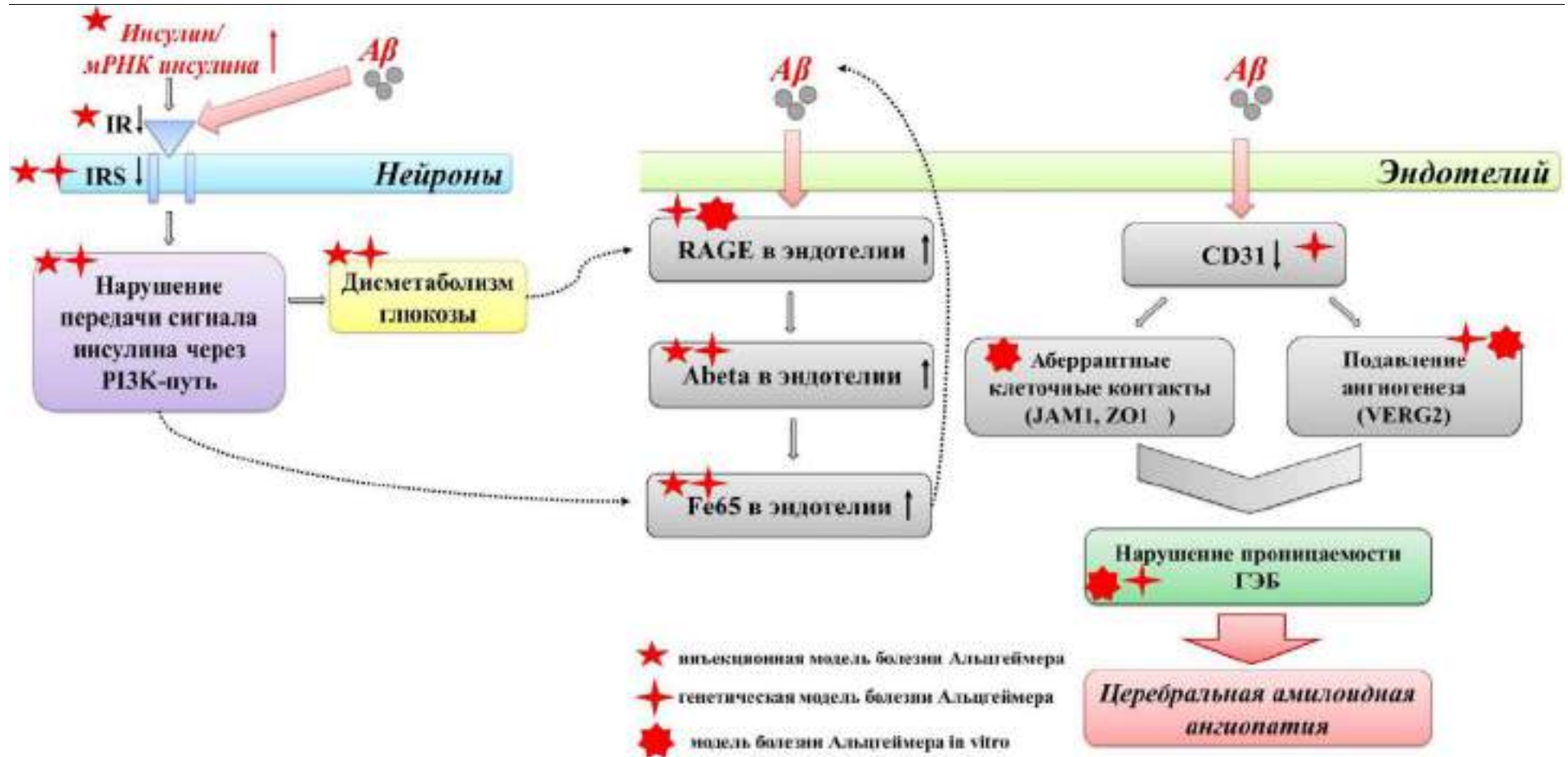


Рисунок 66 – Схема нарушения церебральной микроциркуляции при развитии болезни Альцгеймера, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью

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

Нарушение инсулин-сигнальной трансдукции, наблюдаемое при развитии болезни Альцгеймера, вызывает церебральный дисметаболизм глюкозы, которая является ключевым источником энергии для нервных клеток при реализации ими различных функций, в частности, биосинтеза нейротрансмиттеров [204], поддержании ионных градиентов и потенциала покоя нейронов, генерации потенциалов действия и постсинаптических потенциалов [348].

4.3.1 Нейрональная экспрессия γ H2AX - маркера окислительного повреждения ДНК при развитии болезни Альцгеймера

Результаты ряда исследований показали, что окислительный стресс может быть вовлечен в патогенез болезни Альцгеймера, тем самым выступая в качестве фактора, способствующего прогрессированию нейродегенерации [831]. При этом признаки оксидативного стресса наблюдаются уже на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера [613]. Высокий уровень бета-амилоида индуцирует продукцию активных форм кислорода, а также приводит к снижению биодоступности оксида азота, тем самым вызывая повреждение и в конечном итоге, гибель нейрональных клеток [616].

Поддержание целостности генома имеет важное значение для нормальной экспрессии генов и функционирования клеток. Способность поддерживать целостность генома, вероятно, наиболее важна для постмитотических клеток, таких как нейроны. Кроме того, нейроны имеют очень активный метаболизм и

производят большое количество свободных радикалов, которые могут вызвать окислительное повреждение ДНК [281]. Примечательно, что повышенные уровни повреждения ДНК в стареющем мозге связаны со снижением экспрессии основных генов, в том числе генов, участвующих в пластичности нейронов [493]. Повреждение ДНК нейронов дополнительно усугубляется при многих нейродегенеративных заболеваниях, в частности, при болезни Альцгеймера [506], что может способствовать обширным негативным изменениям в экспрессии генов и потере нейронов.

Повреждение ДНК за счет развития окислительного стресса было подтверждено в различных исследованиях, тем самым указывая на его значимую роль в патогенезе болезни Альцгеймера [619].

Разрыв двуцепочечной молекулы ДНК может оказать негативное влияние на выживание нейронов и их функции, тем самым способствуя нарушению познавательной деятельности и прогрессированию заболевания [506].

Кроме того, установлено, что гены, вовлеченные в окислительный стресс и повреждение / восстановление ДНК, связаны с нейропатологией болезни Альцгеймера [706].

Так, в ходе нескольких исследований была проведена оценка различных биомаркеров окислительного повреждения ДНК в мозге при развитии болезни Альцгеймера, в частности, γ H2AX (фосфорилированная форма гистона H2AX), которая образуется в результате разрыва ДНК [125, 708].

В недавнем исследовании показано увеличение уровня γ H2AX в лимфоцитах как у пациентов с легкими когнитивными нарушениями, так и с болезнью Альцгеймера [705].

Также было установлено, что у пациентов с болезнью Альцгеймера уровень экспрессии γ H2AX в астроцитах в гиппокампе и коре головного мозга значимо выше по сравнению с контрольной группой [566].

Вышеупомянутые исследования указывают на то, что фосфорилирование, обнаруженное в ДНК астроцитов, вызывает хромосомное повреждение, что в

свою очередь нарушает нормальное функционирование нейронов в области гиппокампа.

С другой стороны, формирование двуцепочечных разрывов ДНК – это маркер активации нейронов, связанный с транскрипцией генов немедленного раннего ответа, в частности, *c-fos*, который участвует в регуляции синаптической пластичности и памяти [163, 745].

Таким образом, развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа как при остром действии бета-амилоида, так и при его хроническом отложении в ткани головного мозга сопровождается аккумуляцией γ H2АХ в связи с повреждением ДНК, что вероятно, обусловлено проявлением токсического эффекта бета-амилоида, а не связано с транскрипционно-ассоциированной активностью ДНК-полимеразы II. Это в свою очередь вызывает избыточную продукцию и / или снижение инактивации свободных радикалов, тем самым приводя к аберрантной активности нейронов и, как следствие, прогрессированию заболевания.

4.3.2 Влияние бета-амилоида на синаптическую передачу в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Известно, что физиологическая (пикомолярная) концентрация бета-амилоида [153] положительно регулирует синаптическую передачу посредством повышения вероятности высвобождения пресинаптического нейротрансмиттера [29]. При этом бета-амилоид может повышать высвобождение пресинаптического нейротрансмиттера за счет увеличения пресинаптического Ca^{2+} , активации экзоцитотических каналов Ca^{2+} [102], и регулирования пресинаптических $\alpha 7$ - никотиновых ацетилхолиновых рецепторов [460].

Однако существуют весьма противоречивые результаты, показывающие, что патологический уровень (наномолярный) олигомерного бета-амилоида может оказывать отрицательный [771], положительный [330] или не проявлять выраженного эффекта [475] на высвобождение нейромедиатора из пресинапса.

Кроме того, на постсинаптической мембране нейронов бета-амилоид индуцирует нарушение экспрессии лиганд-зависимых рецепторов, в частности, рецептора AMPA – основного медиатора быстрой возбуждающей синаптической (глутаматергической) передачи в ЦНС, что является одним из признаков синаптической недостаточности при болезни Альцгеймера [599]. Так, обнаружено подавление поверхностных рецепторов AMPA в нейронах, гиперэкспрессирующих либо APP дикого типа или шведскую двойную мутацию APP, либо когда нейроны дикого типа обрабатывались экзогенным олигомером бета-амилоида – Ab 1-42 [44, 133]. Эти сообщения хорошо коррелируют с нашими данными и объясняют уменьшение амплитуд пВПСП нейронов гиппокампа с одновременным замедлением времени нарастания и спада амплитуд пВПСП при введении животным бета-амилоида (**таблица 2**). Ведь, как известно, параметр нарастания амплитуды пВПСП напрямую указывает на силу возбуждающей синаптической передачи – как быстро пресинапс высвобождает нейромедиатор и связывается с лиганд-зависимым каналом [753].

Более вероятно в нашем случае, а именно, в условиях «подострого» токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель заболевания), бета-амилоид запускает каскад патологических реакций, в котором он оказывает влияние на Ca^{2+} -зависимые сигнальные пути. Также кальциневрин, протеинфосфатаза, активируемая Ca^{2+} , могут являться одними из нижестоящих сигнальных молекул, на которые влияет бета-амилоид, поскольку это необходимо для ингибирования долговременной потенциации перфорантного проводящего пути [133], эндоцитоза поверхностных рецепторов AMPA [356], а также дефосфорилирования GluA1-S845 [540]. Помимо активации кальциневрина, бета-амилоид предотвращает активацию CaMKII

(Ca²⁺ / кальмодулин-зависимая протеинкиназа II), необходимую для долговременной потенциации, а также снижает синаптическую кластеризацию CaMKII, что коррелирует со снижением фосфорилирования GluA1-S831, поверхностной экспрессией GluA1 и ингибированием внесинаптической доставки AMPA [299]. Уменьшение концентрации AMPA рецепторов снижает суммарную возбудимость пресинаптических нейронов, что проявляется уменьшением экскреции медиатора из пресинаптической щели. Меньшая концентрация нейромедиатора в синаптической щели уменьшает вероятность связывания и удлиняет время поиска AMPA рецепторов на постсинаптической мембране, что приводит к удлинению времени нарастания пВПСП. Этот эффект также значительно усиливается при уменьшении экспрессии AMPA рецепторов на постсинаптической мембране.

Также нами выявлено нарушение времени пребывания нейромедиатора в синаптической щели, что проявлялось в виде замедления спада амплитуды пВПСП нейронов гиппокампа животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера. Поскольку время нахождения нейромедиатора в синаптической щели зависит от обратного его захвата астроцитами [333], можно рассмотреть данную патологию с точки зрения динамики глутамат-глутаминового цикла, где транспортёры возбуждающих аминокислот (такие как EAAT1 и EAAT2) имеют важное значение [35]. Логично предположить, что чем меньше глутамата в синаптической щели, тем быстрее он будет удалён посредством транспортёров возбуждающих аминокислот. Однако для качественной и быстрой работы этих транспортёров необходима достаточная концентрация и других аминокислот, таких как аспартат и глутамин [793]. Если в наших экспериментах мы не можем судить о концентрации аспартата в синаптической щели, то зависимость концентрации выработки глутамина носит линейный характер и напрямую связана с количеством глутамата в компонентах синапса [764]. Поэтому уменьшение концентрации глутамата в синаптической щели приводит к снижению выработки и секреции глутамина астроцитами, что значительно замедляет захват глутамата такими

транспортёрами, как EAAT2 [72]. Таким образом, можно предположить, что обратный захват нейромедиатора при развитии болезни Альцгеймера будет замедляться вследствие нарушения экспрессии транспортёров возбуждающих аминокислот.

В совокупности, олигомеры бета-амилоида ингибируют долговременную потенциацию и активируют долговременную депрессию [475], что приводит к нарушению синаптической пластичности в гиппокампе и, как следствие, нарушению формирования долговременной памяти.

В то же время в ходе исследования нами выявлено, что бета-амилоид оказывает выраженное влияние на синаптическую передачу нейронов миндалевидного тела, как на уровне пре-, так и на уровне постсинапса. У животных действие бета-амилоида, вероятно, связано с повышением экспрессии AMPA рецепторов на постсинаптической мембране, что оказывает выраженный возбуждающий эффект в виде увеличения возбудимости нейронов миндалевидного тела, о чем указывает повышение амплитуды пВПСП. При этом данный процесс сочетается с ускоренным выведением нейромедиатора из синаптической щели в виде укорочения времени спада амплитуд ВПСП (**рисунок 62**).

Действительно, было показано [335], что активация AMPA рецепторов увеличивает клиренс бета-амилоида в зависимости от дозы, таким образом снижая его внеклеточный уровень. Одновременно AMPA рецепторы способствуют неамилоидогенному расщеплению APP [338], что в совокупности демонстрирует сложную взаимную связь между метаболитами APP и рецепторами глутамата, которая зависит от рецепторного состава, местоположения и стадии развития заболевания

В целом, наши данные свидетельствуют о большей чувствительности нейронов гиппокампа к повреждающему действию бета-амилоида, чем нейронов миндалевидного тела в условиях острого токсического действия бета-амилоида.

4.3.3 Влияние инсулина на синаптическую передачу в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Как известно, СА1 и СА2 области гиппокампа, а также базолатеральные ядра миндалевидного тела содержат значительное количество глутаматергических нейронов [232], влияние на которые инсулина считается доказанным [513]. Ранее было открыто и экспериментально подтверждено, что основное влияние инсулина на головной мозг происходит через инсулиновые рецепторы, которые широко экспрессируются в различных его структурах и, в частности, в пирамидных клетках гиппокампа и миндалевидном теле [573]. Связывание инсулина с этими рецепторами приводит к уменьшению возбудимости нервных клеток практически мгновенно и продолжается длительное время [294]. Длительное уменьшение возбудимости обусловлено каскадом сигналов, приводящих к развитию долговременной депрессии в этих нейронах. Молекулярной основой этого процесса является интернализация GluA2-содержащих AMPA рецепторов постсинаптической мембраны и депонирование их в эндосомах [36]. Так, у мышей, нокаутных по IRS, установлено ярко выраженное снижение глутаматергической нейротрансмиссии в СА1 области гиппокампа [523]. В другом эксперименте у крыс со специфической для гиппокампа инсулинорезистентностью наблюдались нарушения в высокочастотной стимуляции долговременной потенциации, которые были связаны со снижением экспрессии и фосфорилирования субъединиц рецептора глутамата. Кроме того, у крыс с гиппокампальной инсулинорезистентностью наблюдались нарушения пространственного обучения и памяти в тесте «Водный лабиринт Морриса», что подтверждает концепцию, согласно которой церебральная инсулинорезистентность может возникать независимо от периферической инсулинорезистентности и, таким образом, способствовать дефициту нейропластичности при метаболических нарушениях [294].

Приведённые выше исследования хорошо коррелируют с полученными нами данными у животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера. Выраженный эффект от введения 500 нМ инсулина в виде уменьшения амплитуды пВПСП нейронов CA1 области гиппокампа наблюдался у ложно-оперированных животных и продолжался, по крайней мере, в течение 5 мин. Эффект от введения 500 нМ инсулина на нейроны миндалевидного тела был более слабым и менее продолжительным – наиболее выраженное снижение амплитуды пВПСП наблюдалось спустя 1 мин и полностью восстанавливалось до контрольных значений к 4-й мин (**рисунок 63**). Учитывая динамику изменения амплитуд можно предположить, что стойкое длительное уменьшение возбудимости CA1 области гиппокампа связано с развитием долговременной депрессии и интернализацией AMPA рецепторов на постсинаптической мембране [513]. В нейронах миндалевидного тела этот процесс, по всей видимости, инициируется, но не сопровождается интернализацией AMPA рецепторов, что приводит к нестойким эффектам инсулина и их угасанию уже на 4-й мин исследования (точки 1, 2 и 3 на **рисунке 64**). Однако регистрация эффектов инсулина с этой зоны головного мозга имеет большое значение, так как его действие в миндалевидном теле практически не изучено. Тем более имеются сообщения, что инсулиновые рецепторы в нейронах миндалевидного тела представлены довольно широко [439].

Известно, что нарушение функции инсулиновых рецепторов связано с развитием нейродегенеративных заболеваний мозга и, в частности, болезнью Альцгеймера [559]. Поэтому мы выдвинули гипотезу о развитии инсулинорезистентности в нейронах миндалевидного тела у мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (острое токсическое действие бета-амилоида). Наши данные подтвердили эту гипотезу. Действие инсулина в виде постоянного снижения амплитуды пВПСП было выявлено в нейронах базо-латеральной зоны миндалевидного тела ложно-оперированных животных. Для объяснения данного факта необходимо принять выявленное уменьшение

амплитуды в ответ на добавление 500 нМ инсулина, как abortивную долговременную депрессию, где каскад интернализации AMPA не смог привести к закреплению тормозного эффекта – встраиванию этих рецепторов в эндосомы.

Обнаруженное нами негативное влияние бета-амилоида на инсулин-опосредованную динамику амплитуд пВПСП также коррелирует с данными, описанными в литературе и укладывается в теорию инсулинорезистентности при таких нейродегенеративных заболеваниях, как болезнь Альцгеймера [813]. Как было отмечено выше, инсулин через инсулиновые рецепторы на поверхности нейрона, вызывает клатрин-опосредованную интернализацию AMPA рецепторов, что приводит к долговременному уменьшению амплитуды [513]. Поэтому нарушение функции инсулиновых рецепторов должно приводить к уменьшению выраженности или полному исчезновению супрессорного эффекта инсулина на амплитуду пВПСП из-за нарушения самой инициации этого процесса. Наши данные подтверждают эту гипотезу. Изменения амплитуд пВПСП нейронов миндалевидного тела животных с инъекционной моделью болезни Альцгеймера не имеют чёткой направленности и располагаются в области близкой к контрольной линии, что доказывает отсутствие действия, и в первую очередь, влияния инсулина на инсулиновые рецепторы постсинаптической мембраны нейронов.

В целом можно заключить, что развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа как при остром токсическом действии бета-амилоида (инъекционная модель заболевания), так и при его хронической аккумуляции (генетическая модель заболевания), 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 – γ H2AX, что вероятно, связано с проявлением токсического эффекта бета-амилоида, тем самым приводя к дезактивации нейронов.

При этом в условиях острого токсического действия бета-амилоида (инъекционная модель заболевания) 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 бета-амилоида 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 **(рисунок 67)**.

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 при моделировании нейродегенерации влияние инсулина полностью нивелировалось под воздействием бета-амилоида.

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 метаботропных рецепторов, как на пре-, так и на постсинаптической мембране. Эти процессы модулируются бета-амилоидным пептидом. При этом эффекты бета-амилоида, 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 обучения и памяти.

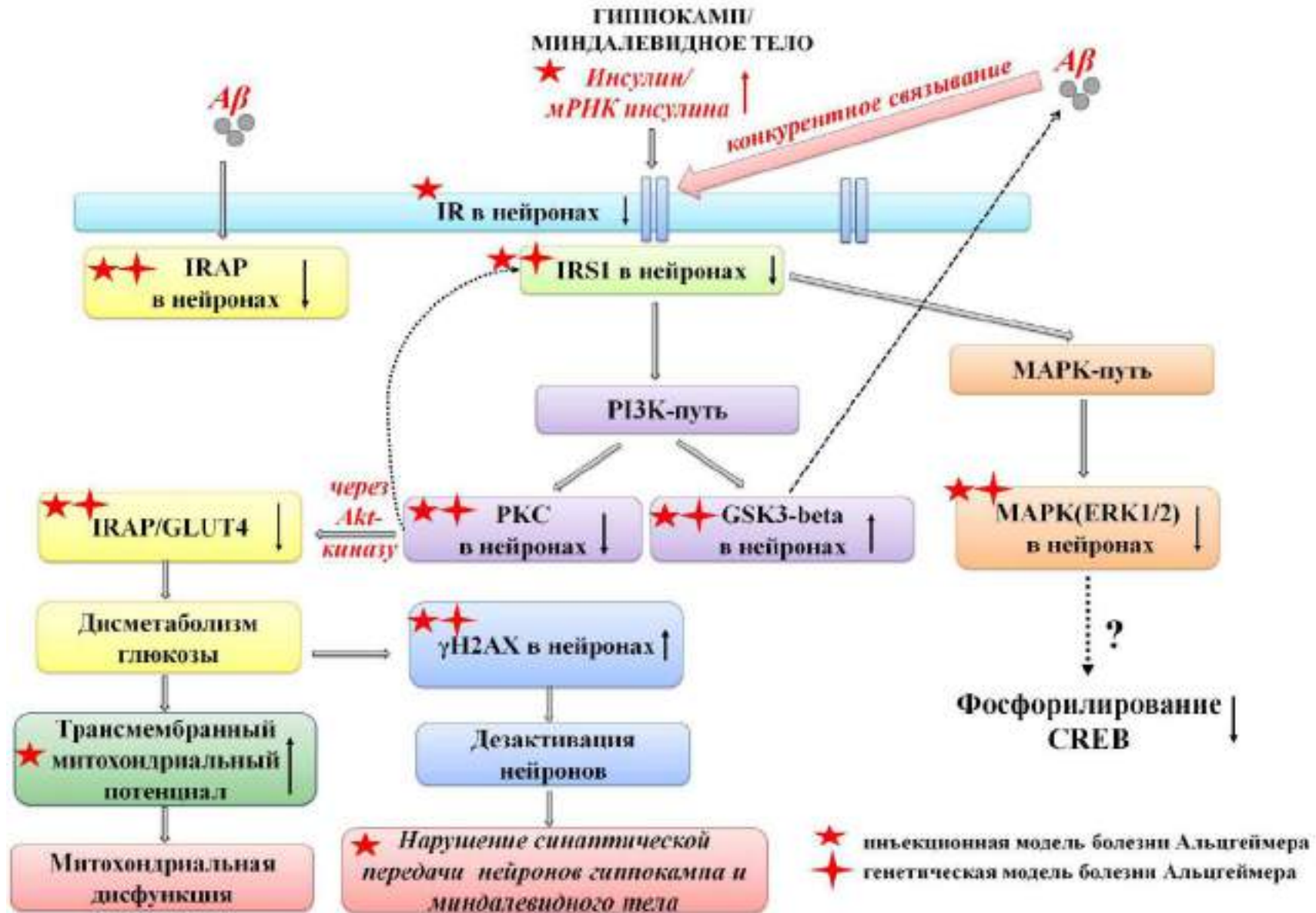


Рисунок 67– Схема развития aberrантной синаптической передачи в нейронах гиппокампа и миндалевидного тела при болезни Альцгеймера, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью

4.4 Особенности развития поведенческих и когнитивных нарушений у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью

Как известно, наиболее яркой характеристикой болезни Альцгеймера является прогрессирующее снижение когнитивных функций и нарушение памяти, вызванное значительной потерей нейронов и синапсов [558]. При этом олигомеры бета-амилоида вызывают структурные изменения синапсов и снижение их плотности [691], что лежит в основе когнитивной дисфункции при болезни Альцгеймера [768].

Важно отметить, что медиальная височная доля является критически важной областью головного мозга, которая поддерживает множество функций, таких как обучение, память и эмоциональное поведение, посредством интеграции нескольких структур, включая гиппокамп и окружающие его области (периринальная, парагиппокампальная и энторинальная кора), миндалевидное тело, поясная извилина, грушевидная кора, передние таламические ядра, гипоталамус и другие структуры [202].

Предполагается, что активация рецепторов инсулина в гиппокампе приводит к индуцированному инсулином усилению когнитивных функций как у грызунов, так и здоровых людей [307, 597]. Несколько исследований с использованием экспериментальной модели инсулинорезистентности на животных убедительно продемонстрировали выраженные нарушения в поведении при решении задач, зависящих от гиппокампа, а именно, в тесте «Водный лабиринт Морриса» [398], тесте «Распознавания объектов» [738] и тесте «Fear conditioning» [293]. Интересен и тот факт, что грызуны с моделью инсулинорезистентности проявляли повышенную тревожность и депрессию. При этом молекулярный механизм, лежащий в основе снижения регуляции рецепторов инсулина в головном мозге и, как следствие, вызывающий

инсулинорезистентность, напрямую связан с развитием депрессивно-подобного состояния и тревожности у животных [699]. Эти данные согласуются с клиническими наблюдениями, согласно которым пациенты с метаболическими расстройствами имеют выраженные когнитивные нарушения [433], а также повышенный риск развития психоневрологических расстройств, таких как депрессивные расстройства [42]. Важно отметить, что эти исследования подтверждают концепцию, согласно которой инсулинорезистентность гиппокампа способствует нарушению функции гиппокампа [233].

Кроме того, ряд исследований также определили важную роль снижения передача сигналов инсулина в гиппокампе в развитии нарушений гиппокамп-зависимого обучения и памяти [720].

Также было признано, что повреждение гиппокампа как структуры головного мозга, имеющей решающее значение для пространственной памяти, наблюдается на самых ранних стадиях развития болезни Альцгеймера [302].

Мы исследовали изменения эмоциональной памяти и обучения в тесте «Fear conditioning» у мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера (при «подостром» токсическом действии бета-амилоида).

Нами установлено, что у мышей после моделирования нейродегенерации выявлено нарушение обучения и памяти страха, поскольку на протяжении всего периода тестирования не формировался условный рефлекс на неприятный стимул.

Также необходимо отметить, что выраженные нарушения ассоциативного обучения и эмоциональной памяти выявлены и в ходе исследования животных с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия 5xFAD), экспериментальные данные которого представлены в работе Комлевой Ю.К.¹²

Известно, формирование условных страхов запускает некоторые поведенческие и физиологические реакции, которые представляют собой защитные реакции – замирание в ответ на раздражающий неприятный стимул

¹² Комлева Ю.К. Молекулярные механизмы формирования нейрогенного микроокружения при нейровоспалении, ассоциированном с нейродегенерацией: дис. ...д-ра мед.наук: 14.03.03/Комлева Юлия Константиновна. – Томск, 2019. - 398 с.

[862]. В отличие от пространственного обучения и памяти, сущность формирования памяти эмоций страха состоит в том, что некоторые непосредственные стимулы запускают активацию гиппокампа, префронтальной коры и миндалевидного тела. Согласованная деятельность данных структур головного мозга оказывает положительное влияние на процессы ассоциативного обучения и эмоциональной памяти [538]. Как правило, время защитной реакции отражает скорость исчезновения воспоминаний о страхе. Патологические механизмы болезни Альцгеймера обычно связаны с уменьшением времени защитной реакции, что указывает на снижение эмоциональной памяти [737]. Так, у мышей с моделью болезни Альцгеймера линии TgCRND8 к 3-месячному возрасту выявлены нарушения как ассоциативного обучения, так и контекстуальной памяти страха из-за дисфункции миндалевидного тела и гиппокампа, что в свою очередь может быть связано с синаптической и нейрональной токсичностью, обусловленной накоплением растворимых и нерастворимых комплексов бета-амилоида на ранней стадии заболевания [726].

Результаты другого исследования демонстрируют ранние значительные нарушения контекстуальной памяти страха у мышей с моделью болезни Альцгеймера, экспрессирующих человеческие мутантные трансгены APP и преселинин 2 (PS2) (мыши линии PS2Tg2576) уже в возрасте 4 месяцев, что указывает на существенное влияние данных генов на развитие патологических изменений эмоциональной памяти [425].

Также интересен и тот недавно установленный факт, что введение мышам тау-белка вызывает развитие инсулинорезистентности, что находит свое отражение в ухудшении процесса ассоциативного обучения и памяти [280]. Учитывая предполагаемую роль тау-белка в регуляции передачи сигналов инсулина в гиппокампе [518], вполне вероятно, что изменения в поведении являются результатом нарушения передачи сигналов инсулина, а не снижения гормонального фона в головном мозге.

Примечательно и то, что интраназальное введение инсулина не только способствует процессу ассоциативного обучения и устранению нарушений памяти страха, но и ее консолидации [241]. При этом положительные эффекты интраназального инсулина на процессы памяти фактически опосредуются поглощением глюкозы [278].

Мы провели масштабный анализ влияния возраста на поведение мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия 5xFAD) с целью выявления когнитивной дисфункции, нарушения различных видов памяти и социализации по мере прогрессирования заболевания.

В целом в более раннем возрасте нарушения в поведении имеют тенденцию быть более незаметными, и, как правило, прогрессируют до выраженных по мере старения и развития заболевания [626]. Примечательно, что нарушения поведения могут начинаться до накопления бета-амилоидных бляшек – факт, который подчеркивает центральную важность растворимых видов бета-амилоида в патогенезе заболевания [697].

Чтобы оценить степень внимания и распознавания нового объекта, а также нарушения рабочей памяти у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера, мы использовали тест «Распознавание нового объекта», в основе которого лежит врожденная склонность мышей исследовать новые объекты, помещенные в знакомую среду. При этом способность распознавать новый объект находится в прямой зависимости от гиппокампа [155].

Так, было показано [420], что инсулинорезистентность, вызванная блокированием гена IR и IRS у мышей, вызывает нарушение передачи сигналов инсулина в CA1 области гиппокампа, приводящее к патологическому изменению синаптической пластичности и нарушению памяти распознавания в тесте «Распознавание нового объекта». Интересно, что снижение экспрессии IR и IRS было обнаружено и в головном мозге при болезни Альцгеймера [548], что дает возможность предполагать о молекулярной связи между церебральной инсулинорезистентностью и снижением когнитивных функций, а именно, нарушением памяти распознавания при развитии болезни Альцгеймера.

В ходе наших исследований установлено, что мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера в возрасте 4 месяцев способны различать новые и уже знакомые объекты аналогично животным контрольной группы. Мы обнаружили, что через 8 месяцев у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера наблюдается выраженное нарушение в распознавании новых объектов, о чем указывают отрицательное значение индекса различия и более низкое значение индекса распознавания по сравнению с животными контрольной группы. В совокупности это указывает на нарушение гиппокамп-зависимых процессов запоминания объектов и распознавания новых при прогрессировании заболевания.

Далее мы исследовали степень тревожности у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера на ранней и поздней стадии заболевания с использованием классического теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», который основан на врожденной склонности грызунов к темным замкнутым пространствам и безусловном страхе (избегание) высоты / открытых пространств [126]. Установлено, что как на ранней, так и на поздней стадии болезни Альцгеймера животные значимо больше времени проводили в открытых, чем в закрытых рукавах по сравнению с животными контрольной группы в аналогичном возрасте, что можно интерпретировать как снижение или отсутствие поведенческого (когнитивного) торможения. Это соотносится с результатами, полученными с использованием других генетических моделей болезни Альцгеймера [455, 456]. При этом можно провести параллель между полученными нами экспериментальными результатами и тенденцией к растормаживанию, наблюдаемой у некоторых пациентов с болезнью Альцгеймера, а именно, неуместным весельем, возбуждением и сумеречным помрачением сознания [152].

Важно и то, что животные с генетической моделью болезни Альцгеймера как в возрасте 4 месяцев, так и спустя 8 месяцев демонстрировали ярко выраженное продолжительное время замирания в открытых рукавах лабиринта, что можно связать с проявлением повышенной тревожности. При этом

снижение двигательной активности по мере прогрессирования заболевания не наблюдалось.

Для дополнительной оценки тревожного поведения у мышей как на ранней стадии болезни Альцгеймера, так и при прогрессировании заболевания использовали тест «Черно-белая камера», основанном на естественном отвращении мышей к ярко освещенным участкам и на их спонтанном исследовательском поведении в ответ на легкие стрессовые факторы, такие как новое окружение и свет [445]. Нами выявлено, что в возрасте 4 месяцев мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера не проявляют склонности к тревоге и страху, поскольку время, проведенное ими в светлой камере и число входов в черную камеру не отличается от контрольной группы животных. Однако через 8 месяцев у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера мы наблюдали выраженное проявление тревожно-депрессивного поведения, что выразалось в более длительном нахождении в светлой камере и тенденции к снижению количества входов в черную камеру.

Согласно многочисленным исследованиям тревожное поведение наблюдается у большинства моделей мышей с болезнью Альцгеймера [86, 456, 458, 544]. При этом как показал ряд исследований за проявления тревожной реакции ответственны такие структуры лимбической системы головного мозга, как миндалевидное тело [769, 807] и гиппокамп, а именно, его вентральная ось [384, 740].

Преобладает мнение, что специфические поведенческие когнитивные изменения связаны с проявлением тенденции к растормаживанию, являющейся результатом развития болезни Альцгеймера [455, 582].

В качестве возможных причин такого поведения могут быть нарушение процессинга APP α -секретазой (поскольку проявление тревоги чаще встречается у трансгенных мышей линии APP) [456, 458, 543], а также дисфункция холинергической системы, играющей важную роль в поведенческом торможении [55, 429].

По результатам другого исследования, подавление IR в гипоталамусе крыс вызывает отчаяние, ангедонию и усиление тревожного поведения, а также структурные и функциональные нарушения в гиппокампе, включая снижение долгосрочной потенциации и морфологические изменения – синаптическую реорганизацию [292]. Также сообщалось о тревожном и депрессивном поведении у мышей линии NIRKO с нейронно-специфическим блокированием IR на фоне выявленной митохондриальной дисфункции, окислительного стресса и повышенной экспрессии моноаминоксидазы [428]. Интересно, что изменение поведения было обнаружено у 17-месячных мышей линии NIRKO, но не у более молодых животных.

Согласно результатам еще одного исследования IR и рецепторы IGF1, экспрессируемые в гиппокампе и миндалевидном теле, играют решающую роль в настроении и познании. Так, мыши, у которых специфически инактивировали IR и рецепторы IGF1 в гиппокампе и миндалевидном теле демонстрировали выраженное тревожное поведение и нарушение когнитивных функций, что указывает на значимое влияние передачи сигналов инсулина на настроение и когнитивные способности [720].

Кроме того, удаление рецептора инсулина в катехоламинергических нейронах ослабляет индуцированную инсулином возбудимость дофаминергических нейронов [436], тогда как введение инсулина в ЦНС крыс увеличивает экспрессию белка-переносчика дофамина [244]. Последнее может быть важным, поскольку изменения в активности дофаминовой и / или серотониновой системах связаны с тревожно-депрессивным поведением [136, 787].

Примечательно, что расторможенное поведение у животных может быть аналогично растормаживанию, наблюдаемому у пациентов с болезнью Альцгеймера, примером которого является изменение личности, расстройства настроения, психозы и несвоевременная эйфория [152, 179]. При этом, как показали пилотные клинические испытания, у пациентов с болезнью Альцгеймера с признаками центральной инсулинорезистентности,

интраназальное введение инсулина заметно снижает скорость развития когнитивной дисфункции [169].

Для оценки общей общительности и реакции на социальную новизну и социальную память мы использовали «Трехкамерный социальный тест», основанный на естественном стремлении у мышей проводить больше времени с социальным объектом (мышь другой линии и противоположного пола), чем с несоциальным (общительность), а также больше исследовать новый социальный объект, чем уже знакомый (социальная новизна) [567]. При этом социальное распознавание и формирование социальной памяти у грызунов облегчают распознавание родства и установление иерархии с использованием различных сигналов, включая обонятельные, феромональные, визуальные и слуховые [605].

Нами выявлено, что в фазе привыкания как на ранней, так и на поздней стадии болезни Альцгеймера животные не проявляли выраженного предпочтения по времени нахождения в левой и правой камере. При оценке общительности в фазе социализации, когда в одну из камер помещали социальный объект, животные с генетической моделью болезни Альцгеймера в возрасте 4 месяцев демонстрировали степень общительности значимо не отличающуюся от животных контрольной группой, однако через 8 месяцев животные проявляли значимо меньше предпочтения к социальному объекту, что указывает на возникновение нарушений социального взаимодействия по мере прогрессирования заболевания. Примечательно, что в фазе предпочтения, когда в одну из камер помещали новый социальный объект, животные с генетической моделью болезни Альцгеймера как на ранней, так и на поздней стадии заболевания преимущественно оставались в камере с уже знакомой мышью. В совокупности эти результаты предполагают, что трансгенные животные проявляют возрастное снижение общительности и свободного социального взаимодействия, а также нарушение социальной памяти, выражающееся в предпочтении уже знакомого социального объекта на фоне повышенной социальной тревожности при взаимодействии с новым, что в

целом приводит к снижению исследовательского поведения. Это согласуется с установленным фактом, согласно которому у пациентов с болезнью Альцгеймера проявляются выраженные деструктивные изменения социального поведения, а именно, возбуждение / агрессия, раздражительность при социальном взаимодействии, снижение общительности вплоть до социальной самоизоляции, которая, как считается, обусловлена возникновением депрессии [42, 355]. Кроме того, как неоднократно демонстрировалось на грызунах с моделью болезни Альцгеймера, социальная изоляция и выраженное нарушение социального взаимодействия способствует дисфункции памяти [41, 471]. Механизмы, опосредующие это нарушение, еще полностью не изучены, но могут включать продукцию бета-амилоида и фосфорилирование тау-белка [361], усиление окислительного стресса и активацию провоспалительных цитокинов [617], сопровождающееся ингибированием противовоспалительных реакций [69], нарушением синаптической пластичности, включая снижение нейротрофических факторов мозга (BDNF) [206], и миелинизации [481].

Интересен и тот установленный факт, что дети с расстройством аутистического спектра и выраженной агрессией имеют более высокие уровни APP в плазме [715].

Кроме того, согласно экспериментальным данным, генетически направленная инактивация именно пирамидных нейронов CA2 области гиппокампа вызывала выраженную потерю социальной памяти, но без выраженных изменений в общительности или нарушении пространственной и эпизодической памяти [337].

В другом исследовании установлено, что введение бета-амилоида крысам вызывает растормаживание нейронов гиппокампа, и, как следствие, нарушение его функций, что находит свое отражение на деструктивных изменениях в социальном поведении при встрече с незнакомой особью, т.е. расторможенная привязанность [878].

Далее мы исследовали изменения пространственного обучения и памяти у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера на ранней и поздней

стадии заболевания с использованием теста «Восьмирукавный радиальный лабиринт», основанном на наличии у грызунов стремлении к выживанию, что включает инстинктивное обнаружение и извлечение пищи [112]. При этом пространственное обучение и память необходимы для записи информации о пространственной ориентации и окружающей среде. Важно подчеркнуть, что гиппокамп играет важную роль в создании и поддержании пространственной памяти и гибкой навигации [115].

Нами установлено, что у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера в возрасте 4 месяцев количество некорректных входов в рукава на протяжении всего периода тестирования значимо не изменялось, в то время как у животных контрольной группы наблюдалось значимое уменьшение количества некорректных входов от первого к четвертому дню тестирования. Стоит отметить, что животные с генетической моделью болезни Альцгеймера совершали значимо большее количество ошибок в четвертый и шестой день тестирования по сравнению с животными контрольной группы.

Через 8 месяцев у животных опытной группы нами также не выявлено значимых изменений в количестве некорректных входов в рукава от первого к шестому дню тестирования. При этом у животных контрольной группы наблюдается тенденция к совершению меньшего количества ошибок на протяжении всего периода тестирования. В целом, полученные результаты указывают на нарушения пространственного обучения, навигации и долговременной памяти, проявляющиеся уже на ранней стадии развития заболевания.

Примечательно, что согласно данным нескольких исследований [45, 46], патологические изменения долгосрочной потенциации, индуцированные в синапсах CA1 области гиппокампа коррелировали с нарушениями пространственного обучения у грызунов в тесте «Восьмирукавный радиальный лабиринт».

Кроме того, показано [347], что как у пациентов с легкими когнитивными нарушениями, так и у пациентов с болезнью Альцгеймера с

выраженной дисфункцией сигнальных молекул или рецепторов в гиппокампе наблюдаются нарушения пространственной навигации [600], пространственной ориентации [592] и зрительно-пространственной памяти [847].

Примечательно и то, что у животных с экспериментальной моделью инсулинорезистентности выявлены структурные и функциональные нарушения нейропластичности, включая снижение нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа [479], снижение плотности дендритных шипов [739], патологические изменения в формировании синапсов [240] и снижение целостности ГЭБ [258], которые могут вносить существенный вклад в нарушение поведения. Так, у мышей с гаплонедостаточным геном IR (т.е. IR +/-) обнаружено нарушение синаптической пластичности, что сопровождается дефицитом пространственного обучения и памяти [578].

Кроме того, делеция как IR, так и рецепторов IGF1 в гиппокампе приводит к нарушению пространственной памяти у мышей [720]. Важен и тот недавно установленный факт, что у мышей линии ApoE4xAPP на ранней стадии развития болезни Альцгеймера (в возрасте 6 месяцев) выявлено нарушение передачи сигналов инсулина в гиппокампе на фоне высокого уровня бета-амилоида, что было тесно связано с дефицитом пространственной памяти [131].

Таким образом, исходя из полученных нами данных, можно заключить, что нейродегенерация альцгеймеровского типа (как при «подостром» токсическом действии бета-амилоида, так и при хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга) сопровождается развитием церебральных метаболических расстройств – локальной инсулинорезистентностью, которая играет ключевую отрицательную роль в aberrантной реализации когнитивных функций, различных видов памяти, а также запоминания, сопряженного с эмоциональной окраской событий, за что главным образом ответственны такие структуры головного мозга, как гиппокамп и миндалевидное тело, которые экспрессируют значительное количество молекул-компонентов инсулин-сигнального пути и подвергаются

значительным патологическим изменениям при прогрессировании болезни Альцгеймера. Безусловно, в совокупности это откладывает свой отпечаток на поведение, в частности, формируется тревожность и заторможенность, нарушаются процессы запоминания, пространственного, социального и ассоциативного обучения, а также способность к социальным взаимодействиям и образованию новых социальных контактов. Это может указывать о вовлеченности в патологический процесс гиппокампа и миндалевидного тела головного мозга, причем чувствительность нейронов гиппокампа к повреждающему действию бета-амилоида на фоне развития локальной инсулинорезистентности существенно выше, чем у нейронов миндалевидного тела.

В целом, это дает возможность предполагать, что причины и следствия церебральной резистентности к инсулину могут быть взаимосвязаны с ключевыми нейропатологическими признаками болезни Альцгеймера, что находит свое отражение в нарушении сложных форм поведения (**рисунок 68, таблица 5**).

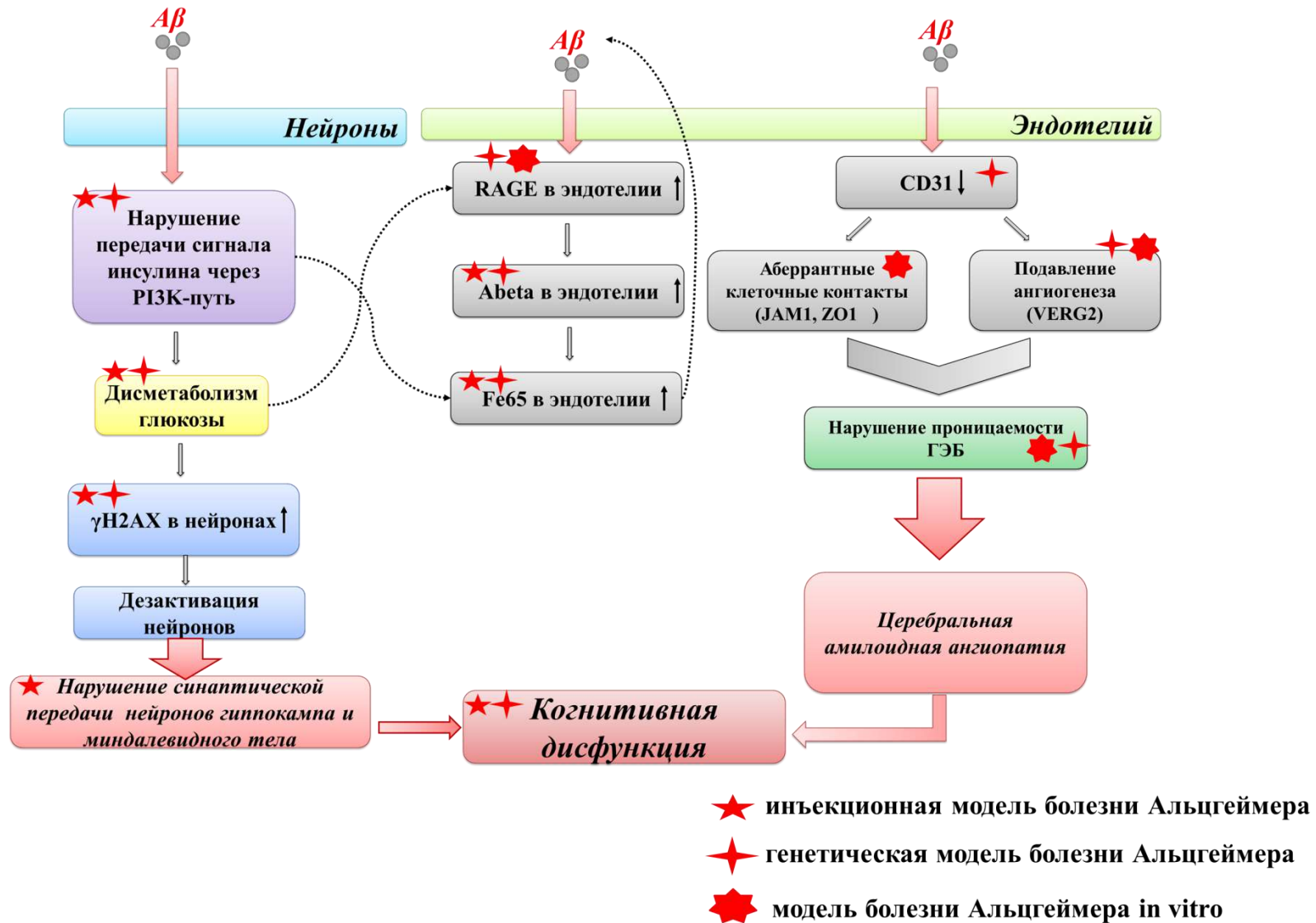


Рисунок 68 – Схема развития когнитивной дисфункции при болезни Альцгеймера, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью

Таблица 5 – Молекулы-маркеры церебральной инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера

Наименование	Экспрессия в клетках (согласно результатам собственных исследований)	Роль в инсулин-сигнальном пути	Модуляция активности	Ссылки
Abeta	Церебральный эндотелий	Конкурентное связывание с рецептором инсулина.	Активация Abeta нарушает структурно-функциональную целостность ГЭБ, снижает церебральный кровоток, транспорт глюкозы к нервным клеткам.	[63, 114, 317, 629, 655, 778]
Fe65	Церебральный эндотелий	Участвует в образовании синапсов и регуляции синаптической пластичности, нейрогенезе, миграции нейронов и разрастании нейритов, в обучении и памяти.	Блокирование Fe65 вызывает снижение секреции бета-амилоида в нервных клетках.	[542, 742, 747]
RAGE	Церебральный эндотелий	Транспортер бета-амилоида в ткани головного мозга.	Активация RAGE вызывает дисметаболизм глюкозы и церебральную сосудистую дисфункцию. Ингибирование RAGE снижает накопление бета-амилоида в паренхиме головного мозг.	[187, 437]

γH2AX	Нейроны	Маркер активации нейронов, связанный с транскрипцией генов немедленного раннего ответа, в частности, c-fos, который участвует в регуляции синаптической пластичности и памяти. Маркер аккумуляции двуцепочечных разрывов ДНК в клетках.	Активация γ H2AX вызывает хромосомное повреждение, и нарушает нормальное функционирование нейронов.	[163, 745]
IR	Нейроны	Связывание инсулина с внеклеточными α -субъединицами IR приводит к димеризации и аутофосфорилированию β -субъединиц IR и активации его киназной активности, что играет роль в механизмах выживания клеток – дифференцировка, регуляция роста и метаболическая активность.	Ингибирование IR приводит к нарушению синаптической пластичности за счет активации GSK-3beta.	[427, 762]
IRS1	Нейроны	Фосфорилирование IRS1 по остатку тирозина активирует его киназную активность и передачу сигнала вниз по PI3K- и MAPK-пути.	Ингибирование IRS1 приводит к снижению активности PI3K Akt и увеличению уровня GSK-3beta, вызывая нарушение синаптической пластичности.	[122, 313]
GSK3-beta	Нейроны	За счет связывания с такими белковыми субстратами как гликогенсинтаза, β -катенин, тау-белок, промежуточные филаменты, белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент (CREB) и др. осуществляется регуляция клеточной пролиферации, миграции, гомеостаза глюкозы, апоптоза и нейропластичности.	Усиление активности GSK-3beta индуцирует накопление бета-амилоида, нарушение целостности синапсов, нейрональную дисфункцию, апоптоз.	[147, 331, 454, 757]

PKC	Нейроны	Активирует синтез белков, гликогена, поглощение глюкозы, участвует в синаптогенезе, что необходимо для обучения, формирования и развития памяти.	Снижение активности PKC приводит к нарушению поглощения глюкозы, увеличению концентрации нейротоксичного бета-амилоида.	[494, 573]
MAPK	Нейроны	Регуляция транскрипции CREB, протоонкогенного белка Мус и киназы рибосомного белка S6K α 3, влияющий на пролиферацию, дифференцировку клеток, врожденную и адаптивную иммунную функцию и нейропластичность.	Ингибирование MAPK вызывает синаптическую дисфункцию.	[359, 405, 749, 767]
IRAP	Нейроны, астроциты	Является рецептором ангиотензина IV (AngIV), который потенцирует поглощение глюкозы в нейронах гиппокампа, тем самым выступая в качестве регулятора памяти. Регулирует рециркуляцию GLUT4 из эндосом в везикулы после его транслокации и последующего эндоцитоза.	Ингибирование IRAP приводит к снижению базального и стимулированного инсулином захвата глюкозы нервными клетками, уменьшению экспрессии GLUT4.	[389, 844]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метаболические нарушения в ткани головного мозга находятся в центре внимания современных исследований в области нейробиологии, нейрохимии и неврологии. Актуальность таких исследований обусловлена стремлением к детальному и глубокому познанию молекулярных механизмов нейродегенерации альцгеймеровского типа, которую в настоящее время обоснованно считают проявлением локальной инсулинорезистентности в головном мозге. Возникновение за последние десятилетия таких понятий, как метаболично-когнитивный синдром, сахарный диабет 3 типа, ставит важные задачи поиска новых подходов к эффективной фармакологической коррекции нарушений регуляции метаболизма для предотвращения прогрессирования нарушений высшей нервной деятельности при болезни Альцгеймера. Кроме того, на фоне развития локальной инсулинорезистентности в патогенез болезни Альцгеймера важный вклад могут вносить церебральные сосудистые изменения, в совокупности составляя сложный комплекс нарушений, приводящих к выраженной когнитивной дисфункции и потере памяти, тем самым значительно снижая продолжительность жизни.

С учетом того, что в подавляющем большинстве исследований оценка когнитивной дисфункции доминирует, а изменениям эмоциональной сферы при болезни Альцгеймера уделяют значительно меньше внимания, настоящее исследование было предпринято с целью изучения молекулярных механизмов нарушения продукции, транспорта и эффектов инсулина в клетках как нейрональной, так и эндотелиальной природы, определяющих вклад локальной инсулинорезистентности в прогрессировании нарушений не только когнитивной, но и эмоциональной сферы при экспериментальной болезни Альцгеймера.

В связи с этим, в качестве ключевых объектов исследования мы выбрали гиппокамп и миндалевидное тело головного мозга, находящихся в тесной

функциональной связи при реализации когнитивных функций и запоминания, сопряженных с эмоциональной окраской событий, экспрессирующих значительное количество рецепторов инсулина и демонстрирующих выраженные нарушения атрофического плана при прогрессировании болезни Альцгеймера. Для выполнения поставленных задач нами были выбраны две экспериментальные модели болезни Альцгеймера – инъекционная модель, при которой реализуется острый нейротоксический эффект бета-амилоида, и генетическая модель, которая воспроизводит сформировавшуюся нейродегенерацию в условиях хронической аккумуляции бета-амилоида в ткани головного мозга.

По результатам проведенных нами исследований следует, что

1. Нарушение передачи сигналов инсулина в головном мозге при развитии болезни Альцгеймера может быть обусловлено частичным ингибированием регуляции IRS1 в клетках нейрональной природы в миндалевидном теле (как при «подостром» токсическом действии бета-амилоида – инъекционная модель, так и при его хронической аккумуляции в ткани головного мозга – генетическая модель), а также IR и IRS1 в гиппокампе (при «подостром» токсическом действии бета-амилоида – инъекционная модель), препятствуя дальнейшей передаче сигналов и приводя, в конечном итоге, к инсулинорезистентности.

2. Синтез инсулина в головном мозге можно рассматривать в качестве альтернативного источника инсулина в ЦНС, что подтверждается обнаруженным нами высоким уровнем экспрессии гена *insulin I* как в гиппокампе, так и миндалевидном теле в условиях «острого» токсического действия бета-амилоида. Более того, с учетом того, что только 1% периферического инсулина проникает через ГЭБ [79], выявленное нами значимое ($P=0,0169$) взаимное влияние «интрагиппокампальная инъекция×область головного мозга» на уровень инсулина, а также тенденция ($P>0,05$) к увеличению уровня инсулина в миндалевидном теле, подтверждает гипотезу о том, что инсулин может быть синтезирован в головном мозге.

3. Молекулярный механизм, лежащий в основе нарушения нейрональной передачи сигналов инсулина в головном мозге при развитии болезни Альцгеймера заключается в том, что острое токсическое действие бета-амилоида вызывает повышение уровня экспрессии гена *insulin I* в гиппокампе и миндалевидном теле, что сопровождается снижением в нейронах экспрессии IR и IRS1, уменьшением экспрессии PKC, увеличением экспрессии GSK3-beta, уменьшением экспрессии MAPK (ERK1/2) и инсулин-регулируемой аминопептидазы IRAP. В нейронах снижение уровня IRAP/GLUT4 приводит к повышению трансмембранного митохондриального потенциала и увеличению уровня лактата в ткани головного мозга. Хроническая аккумуляция бета-амилоида в нейронах миндалевидного тела вызывает уменьшение экспрессии IRS1, что сопровождается снижением экспрессии PKC, увеличением экспрессия GSK3-beta, уменьшением экспрессии MAPK (ERK1/2) и инсулин-регулируемой аминопептидазы IRAP. Данный каскад патологических реакций приводит к интенсификации процессов образования и накопления бета-амилоида в ткани головного мозга, что в итоге замыкает «порочный круг патогенеза».

4. В основе нарушения структурно-функциональной целостности ГЭБ в результате токсического действия бета-амилоида при развитии болезни Альцгеймера лежит снижение экспрессии в эндотелии церебральных микрососудов рецептора 2 эндотелиального фактора роста сосудов VEGFR2, белков плотных и адгезивных контактов JAM1 и ZO1, увеличение экспрессии RAGE. Блокирование в церебральном эндотелии экспрессии RAGE частично предотвращает развитие патологической проницаемости ГЭБ, что позволяет нивелировать негативные эффекты бета-амилоида.

5. В гиппокампе при остром токсическом действии бета-амилоида происходит ингибирование долговременной потенциации и активация долговременной депрессии, о чем указывает уменьшение амплитуд пВПСП нейронов гиппокампа с одновременным замедлением времени нарастания и спада амплитуд пВПСП. Это приводит к нарушению синаптической

пластичности в гиппокампе и, как следствие, нарушению формирования долговременной памяти.

В миндалевидном теле острое действие бета-амилоида вызывает нейропротективное действие, что проявляется увеличением возбудимости нейронов и ускорением высвобождения нейромедиатора в синаптическую щель в синапсах.

7. В физиологических условиях эффект инсулина на нейроны миндалевидного тела проявлялся снижением возбудимости нейронов в виде сокращения амплитуды пВПСП, что приводит к развитию долговременной депрессии в этих нейронах. Острое токсическое действие бета-амилоида нарушает этот паттерн, нивелируя эффекты инсулина на синаптическую передачу в нейронах миндалевидного тела.

Результаты исследования с использованием инъекционной модели болезни Альцгеймера

В результате выполнения исследовательской работы с использованием современных методов нейробиологии, нейрохимии, клеточной биологии, молекулярной генетики, биофизики получены были следующие результаты:

1) Нейродегенерация альцгеймеровского типа (при «подостром» токсическом действии бета-амилоида) сопровождается гиперэкспрессией гена инсулина в гиппокампе и миндалевидном теле, что сопряжено с тенденцией повышения уровня инсулина в ткани миндалевидного тела головного мозга. Это приводит к нарушению экспрессии молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции – IR, IRS1, MAPK, GSK3-beta и PKC, а также снижению уровня экспрессии IRAP в колоколизации с GLUT4, что вызывает развитие церебрального дисметаболизма глюкозы, ассоциированного с повышением уровня лактата в ткани головного мозга.

2) Аберрантный метаболизм глюкозы вызывает гиперполяризацию мембраны митохондрий вследствие нарушения митохондриального

окислительного метаболизма в клетках головного мозга, индуцированного нейротоксическим эффектом бета-амилоида, что, в конечном итоге, приводит к развитию митохондриальной дисфункции.

3) Нарушение инсулин-сигнальной трансдукции провоцирует накопление бета-амилоида (Abeta) и гиперэкспрессию адапторного для APP белка Fe65 в эндотелии гиппокампа, тем самым приводя к дисфункции эндотелия, и, как следствие, нарушению структурно-функциональной целостности ГЭБ.

4) Развитие локальной инсулинорезистентности при нейродегенерации альцгеймеровского типа сопровождается дисметаболизмом глюкозы, которая провоцирует aberrantную экспрессию VEGFR2 и RAGE в эндотелии церебральных микрососудов *in vitro*. Это вызывает развитие эндотелиальной дисфункции, и повышение проницаемости ГЭБ *in vitro*, 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*.

4) Патологическое изменение экспрессии ключевых молекул-компонентов инсулин-сигнального пути в условиях острого токсического действия бета-амилоида вызывает аккумуляцию в нейронах маркера двуцепочечных разрывов ДНК γ H2AX, приводя к нейрональной дисфункции. Это негативно сказывается на синаптической передаче нервного импульса и синаптической пластичности в нейронах гиппокампа и миндалевидного тела, что в конечном итоге находит свое отражение на процессах обучения и памяти.

5) Развитие церебральных метаболических расстройств (локальной инсулинорезистентности) при нейродегенерации альцгеймеровского типа вносит существенный вклад в развитие дефицита эмоциональной памяти, что проявляется в нарушении процессов ассоциативного обучения и запоминания эмоционально окрашенных событий, что свидетельствует о вовлеченности в патологический процесс гиппокампа и миндалевидного тела головного мозга.

Результаты исследования с использованием генетической модели болезни Альцгеймера

1) Развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа характеризуется aberrантной экспрессией молекул-компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции – IRS1, MAPK, GSK3-beta и PKC, а также снижением уровня экспрессии IRAP в колоколлизации с GLUT4, что вызывает развитие дисметаболизма глюкозы в ткани головного мозга.

2) Нарушение передачи сигналов инсулина способствует накоплению бета-амилоида (Abeta) и гиперэкспрессии адапторного для APP белка Fe65 в эндотелиальных клетках гиппокампа. Это сопряжено 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 тех или иных областях гиппокампа), что в совокупности вызывает повышение проницаемости ГЭБ *in vivo*. Выявленное нарушение церебрального метаболизма глюкозы приводит к накоплению RAGE в эндотелии гиппокампа, что индуцирует аккумуляцию бета-амилоида в церебральных микрососудах, вызывая развитие сосудистых нарушений при болезни Альцгеймера.

3) Нарушение экспрессии ключевых молекул-компонентов инсулин-сигнального пути, сопряженное с хроническим отложением бета-амилоида при развитии болезни Альцгеймера, вызывает аккумуляцию маркера двуцепочечных разрывов ДНК γ H2AX в нейронах, приводя к нейрональной дисфункции, что негативно отражается на процессах обучения и запоминания.

4) Развитие церебральной инсулинорезистентности при нейродегенерации альцгеймеровского типа оказывает существенное отрицательное влияние на реализацию когнитивных функций, что проявляется в формировании тревожности и заторможенности, нарушении процессов запоминания, пространственного и социального обучения, а также способности к социальным взаимодействиям и образованию новых социальных контактов.

Это дает возможность предполагать, что причины и следствия церебральной резистентности к инсулину могут быть взаимосвязаны с ключевыми нейropатологическими признаками болезни Альцгеймера, что находит свое отражение в нарушении сложных форм поведения.

Таким образом, как острое действие бета-амилоида, так и его хроническая аккумуляция вызывают развитие aberrантной передачи сигналов инсулина в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга, тем самым запуская каскад реакций, приводящих к интенсификации процессов образования и накопления бета-амилоида в ткани головного мозга, что в итоге замыкает «порочный круг патогенеза» (**рисунок 69**).

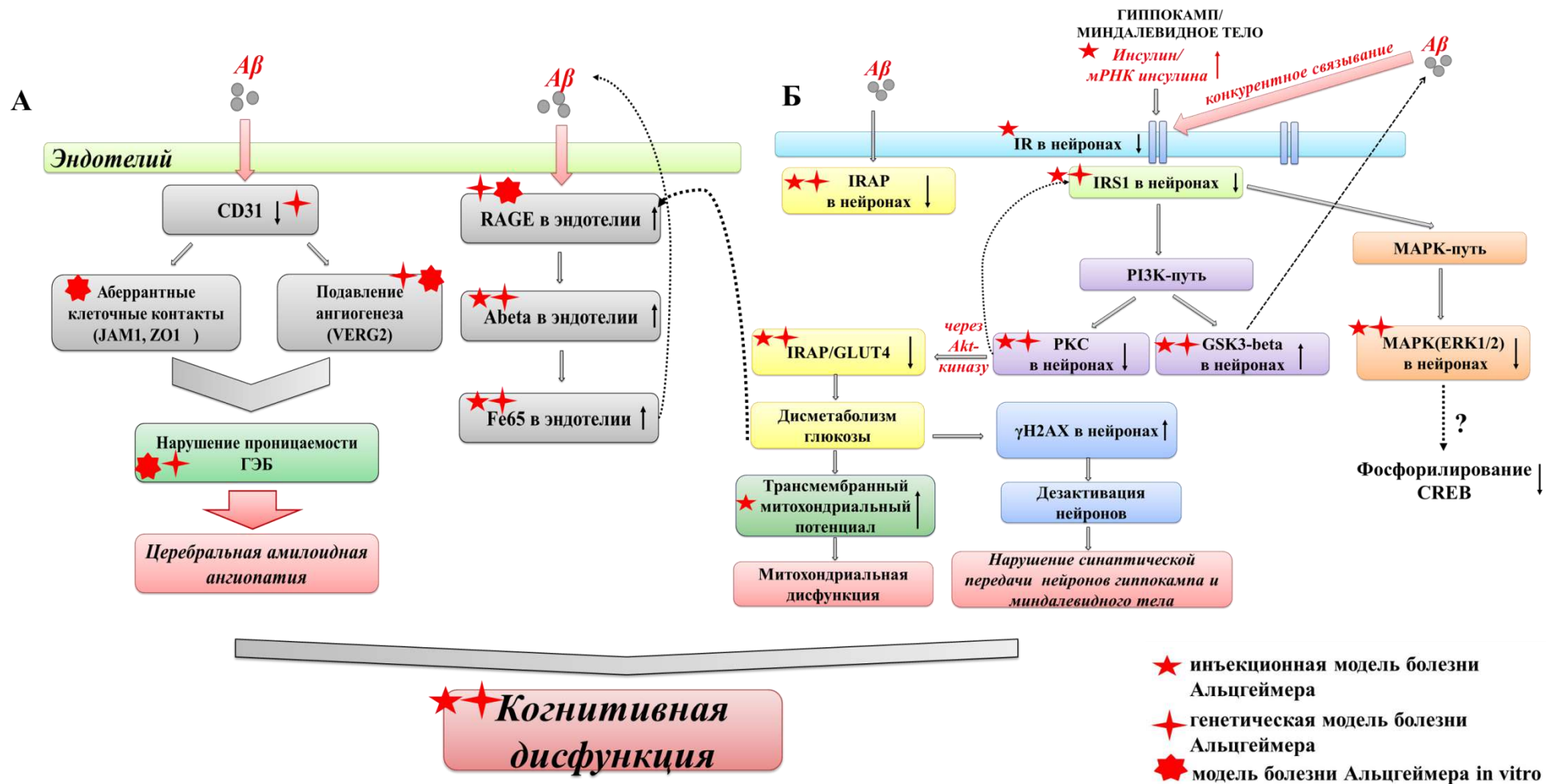


Рисунок 69 – Схема патогенеза нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с локальной инсулинорезистентностью

А – в церебральном эндотелии, Б – в нейронах.

ВЫВОДЫ

1. При остром токсическом действии A 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 аминокислотоксидазы 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 бета-амилоида (мышь 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 аминокислотоксидазы IRAP (в 2 раза).

3. Острое токсическое действие бета-амилоида и его хроническая аккумуляция приводят к нарушению структурной целостности ГЭБ, что проявляется в эндотелии гиппокампа повышением экспрессии Fe65 (в 1,5 раза) и накоплением A β (увеличение уровня в 2 и 3,5 раза, соответственно). В эндотелиальных клетках гиппокампа у мышей линии 5xFAD хроническая аккумуляция бета-амилоида 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 бета-амилоида *in vitro* вызывает нарушение структурно-функциональной целостности гемато-энцефалического барьера, которая 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 церебральной эндотелии экспрессии RAGE частично предотвращает развитие патологической проницаемости гемато-энцефалического барьера.

5. В нейронах гиппокампа острое токсическое действие бета-амилоида *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 бета-амилоида и находит свое отражение в нарушении процессов ассоциативного обучения и эмоциональной памяти.

6. В патогенезе нейродегенерации альцгеймеровского типа в результате острого токсического действия бета-амилоида 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 (GSK3-beta, PKC). Дисрегуляция PKC вызывает нарушение экспрессии IRAP/GLUT4, и церебральный дисметаболизм глюкозы, что сопряжено с нейрональной аккумуляцией γ H2AX, нарушением экспрессии в церебральной эндотелии молекул, участвующих в реализации биологических

эффектов бета-амилоида (Fe65, RAGE), а также молекул-регуляторов проницаемости ГЭБ или неоангиогенеза (JAM1, ZO1, VEGF2), что в конечном итоге приводит к формированию aberrантной нейропластичности, когнитивному дефициту и амилоидной ангиопатии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- Akt – protein kinase B alpha – протеинкиназа B
- AMPA – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
- AngIV – angiotensin IV – ангиотензин IV
- APOE – apolipoprotein E – аполипопротеина E
- APP – amyloid precursor protein – белок-предшественник бета-амилоида
- CA1 – Cornu Ammonis
- CREB - cAMP response element-binding protein – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор
- 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
- IGF – insulin-like growth factor – инсулиноподобный фактор роста
- IGF2R – Insulin-like growth factor 2 receptor – рецептор инсулиноподобного фактора роста 2
- IR – insulin receptor – инсулиновый рецептор
- IRAP – insulin regulated aminopeptidase – инсулин-регулируемая аминопептидаза
- IRS – insulin receptor substrate – субстрат инсулинового рецептора
- JNK – c-Jun N-terminal kinase – c-Jun N-терминальная киназа
- MAPK – mitogen-activated protein kinase – митоген-активированная протеинкиназа
- Mean – среднее значение
- MSK1 – mitogen- and stress-activated protein kinase-1 – митоген- и стрессактивируемая киназа 1
- NF- κ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерный фактор «каппа-би»
- NO – оксид азота
- PI3K – phosphoinositide-3-kinase – фосфатидилинозитид-3 киназа

PKC – protein kinase C – протеинкиназа C

PSEN – пресенилин

S.E.M. – стандартная ошибка среднего

TNF- α – tumor necrosis factor alpha – фактора некроза опухоли- α

A β – бета-амилоид

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

пВПСП – полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы

СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов Д.В., Терентьев А.А. Характеристика биохимических маркеров нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера и функционирования центральной нервной системы // Нейрохимия. 2013. № 3 (30). С. 179.
2. Боголепова А.Н. Болезнь Альцгеймера и сахарный диабет // Медицинский совет. 2015. № 18. С. 36–40.
3. Бондарева В.М., Чистякова О.В. Инсулин и инсулинрецепторная сигнальная система мозга // Нейрохимия. 2007. № 1 (24). С. 8–20.
4. Булгакова С.В., Романчук П.И., Тренева Е.В. Инсулин, головной мозг, болезнь Альцгеймера: новые данные // Бюллетень науки и практики. 2020. № 3 (6). С. 96–126.
5. Васильева А.В. Связь болезни Альцгеймера с сахарным диабетом, обоснование и применение инсулинотерапии при болезни Альцгеймера // Аллея науки. 2019. № 1 (4). С. 550–559.
6. Ганькина О.А., Левин О.С., Ильясова Ф.Н. Когнитивные нарушения у пациентов с метаболическим синдромом // Эффективная фармакотерапия. 2016. № 29. С. 16–22.
7. Захаров В.В., Вахнина Н.В., Громова Д.О. Когнитивные нарушения и метаболический синдром // Доктор.Ру. 2016. № 4 (121). С. 14–21.
8. Иванникова Е.В. [и др.]. Изучение роли факторов роста фибробластов (β FGF, TGF β 1), маркеров воспаления (IL-6, TNF- α , CRP) и конечных продуктов гликирования (AGE, RAGE) у пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа // Сахарный диабет. 2013. № 3. С. 64–70.
9. Исикова Х.В. [и др.]. Ремоделирование микроциркуляторного русла связано с воспалением и окислительным стрессом у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2008. № 6 S1 (7). С. 157b–1158.

10. Камчатнов П.Р. [и др.]. Хронические расстройства мозгового кровообращения у больных сахарным диабетом 2 типа // Клиницист. 2007. № 2 (2). С. 9–15.
11. Ключник Т.П. [и др.]. Потенциальные маркеры болезни Альцгеймера, ассоциированные с воспалением // Психиатрия. 2014. № 1 (61). С. 28–34.
12. Мальцев А.В., Галзитская О.В. Образование и участие наноамилоидов в патогенезе болезни Альцгеймера и других амилоидогенных заболеваний // Биомедицинская химия. 2010. № 6 (56). С. 624–638.
13. Манухина Е.Б. [и др.]. Сосудистые факторы риска болезни Альцгеймера и возможность их модификации с помощью адаптации к периодической гипоксии // Патогенез. 2016. № 1 (14). С. 18–26.
14. Моргун А.В. [и др.]. Дифференцировка эмбриональных прогениторных клеток мозга крыс в астроциты и нейроны // Сибирское медицинское обозрение. 2013. № 6. С. 9–12.
15. Мухамеджанов Э.К., Есырев О.В. Сахарный диабет 2 типа: новые стороны патогенеза заболевания // Сахарный диабет. 2013. № 4. С. 49–51.
16. Помыткин И.А. [и др.]. Инсулиновый рецептор в мозге: новая мишень в лечении центральной инсулиновой резистентности // Биомедицина. 2018. № 3. С. 17–34.
17. Пономарева Н.В. [и др.]. Влияние генетических факторов на нейрофизиологические механизмы нейродегенеративных заболеваний // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2018. № 12. С. 46–54.
18. Расин С.М., Подкорытов В.С., Расин М.С. Роль хронического системного воспаления и инсулинорезистентности в патогенезе сенильных деменций // Психиатрия. 2011. № 2 (50). С. 46–54.
19. Сахаров Д.А., Аверина Ю.М., Курбатов А.Ю. Методики анализа состояния клеточных культур ГЭБ // Успехи в химии и химической технологии. 2019. № 5 (33). С. 91–92.
20. Соловьев В.Б. Нейропептиды: структурно-функциональная классификация // Actualscience. 2015. № 4 (1). С. 22–35.

21. Танашян Н.Н., Лагода О.В., Антонова К.В. Цереброваскулярная патология и метаболический синдром / Танашян Н.Н., Лагода О.В., Антонова К.В., Москва: АСТ-375, 2019. 376 с.
22. Тепляшина Е.А. [и др.]. Нейропептиды в регуляции активности головного мозга в норме и при нейродегенерации // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020. № 8 (23). С. 3–10.
23. Тюменцев М. А. [и др.]. Митохондрии с характерной для пациентов с болезнью Альцгеймера морфологией в мозге крыс OXYS // Биохимия. 2018. № 9 (83). С. 1361–1367.
24. Чистякова О.В., Шпаков А.О. Современные достижения в изучении глюкозных транспортеров в центральной нервной системе // Цитология. 2019. № 3 (61). С. 235–246.
25. Abbott M. A., Wells D. G., Fallon J. R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 1999. № 17 (19). С. 7300–7308.
26. Abbott N. J. Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery // Journal of Inherited Metabolic Disease. 2013. № 3 (36). С. 437–449.
27. Abbott N. J., Rönnbäck L., Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier // Nature Reviews Neuroscience. 2006. № 1 (7). С. 41–53.
28. Abeti R. [и др.]. «Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in Friedreich’s ataxia» // Cell Death & Disease. 2016. № 5 (7). С. e2237–e2237.
29. Abramov E. [и др.]. Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses // Nature Neuroscience. 2009. № 12 (12). С. 1567–1576.
30. Acosta J. I. [и др.]. An update on the cognitive impact of clinically-used hormone therapies in the female rat: models, mazes, and mechanisms // Brain Research. 2013. (1514). С. 18–39.

31. Adams S. J. [и др.]. Overexpression of Wild-Type Murine Tau Results in Progressive Tauopathy and Neurodegeneration // *The American Journal of Pathology*. 2009. № 4 (175). С. 1598–1609.
32. Adeva-Andany M. M. [и др.]. Liver glucose metabolism in humans // *Bioscience Reports*. 2016. № 6 (36). С. e00416.
33. Agis-Balboa R. C. [и др.]. A hippocampal insulin-growth factor 2 pathway regulates the extinction of fear memories: IGF signalling regulates fear extinction // *The EMBO Journal*. 2011. № 19 (30). С. 4071–4083.
34. Agostinone J. [и др.]. Insulin signalling promotes dendrite and synapse regeneration and restores circuit function after axonal injury // *Brain*. 2018. № 7 (141). С. 1963–1980.
35. Aguilar J. I. [и др.]. Neuronal Depolarization Drives Increased Dopamine Synaptic Vesicle Loading via VGLUT // *Neuron*. 2017. № 5 (95). С. 1074-1088.e7.
36. Ahmadian G. [и др.]. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD // *The EMBO Journal*. 2004. № 5 (23). С. 1040–1050.
37. Akash M. S. H., Rehman K., Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013. № 3 (114). С. 525–531.
38. Akhtar A., Sah S. P. Insulin signaling pathway and related molecules: Role in neurodegeneration and Alzheimer's disease // *Neurochemistry International*. 2020. (135). С. 104707.
39. Albiston A. L. [и др.]. Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: Heads and tails? // *Pharmacology & Therapeutics*. 2007. № 3 (116). С. 417–427.
40. Albiston A. L. [и др.]. Identification and characterization of a new cognitive enhancer based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase // *The FASEB Journal*. 2008. № 12 (22). С. 4209–4217.

41. Ali A. A. [и др.]. Study on Social Isolation as a Risk Factor in Development of Alzheimer's Disease in Rats // *Brain Disorders & Therapy*. 2017. № 02 (06).
42. Ali S. [и др.]. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis: Review article // *Diabetic Medicine*. 2006. № 11 (23). С. 1165–1173.
43. Alkon D. L., Sun M.-K., Nelson T. J. PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007. № 2 (28). С. 51–60.
44. Almeida C. G. [и др.]. Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses // *Neurobiology of Disease*. 2005. № 2 (20). С. 187–198.
45. Altinbilek B., Manahan-Vaughan D. Antagonism of group III metabotropic glutamate receptors results in impairment of LTD but not LTP in the hippocampal CA1 region, and prevents long-term spatial memory: Group III mGluRs are required for LTD and spatial learning // *European Journal of Neuroscience*. 2007. № 5 (26). С. 1166–1172.
46. Altinbilek B., Manahan-Vaughan D. A specific role for group II metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term depression and spatial memory // *Neuroscience*. 2009. № 1 (158). С. 149–158.
47. Alzheimer's Association 2016 Alzheimer's disease facts and figures // *Alzheimer's & Dementia*. 2016. № 4 (12). С. 459–509.
48. Alzheimer's Association 2019 Alzheimer's disease facts and figures // *Alzheimer's & Dementia*. 2019. № 3 (15). С. 321–387.
49. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative [и др.]. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy // *Nature*. 2017. № 7673 (549). С. 523–527.
50. Ambrée O. [и др.]. Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of Aging*. 2009. № 8 (30). С. 1192–1204.

51. Ameen-Ali K. E. [и др.]. Review: Neuropathology and behavioural features of transgenic murine models of Alzheimer's disease // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2017. № 7 (43). С. 553–570.
52. An Y. [и др.]. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia*. 2018. № 3 (14). С. 318–329.
53. Andersen M. [и др.]. IGF1 and IGF2 specificities to the two insulin receptor isoforms are determined by insulin receptor amino acid 718 // *PLOS ONE*. 2017. № 6 (12). С. e0178885.
54. Antunes M., Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications // *Cognitive Processing*. 2012. № 2 (13). С. 93–110.
55. Apelt J., Kumar A., Schliebs R. Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human β -amyloid precursor protein // *Brain Research*. 2002. № 1–2 (953). С. 17–30.
56. Apelt J., Mehlhorn G., Schliebs R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain // *Journal of Neuroscience Research*. 1999. № 5 (57). С. 693–705.
57. Apostolatos A. [и др.]. Insulin Promotes Neuronal Survival via the Alternatively Spliced Protein Kinase C δ II Isoform // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. № 12 (287). С. 9299–9310.
58. Armstrong R. A. The Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Reevaluation of the “Amyloid Cascade Hypothesis” // *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. (2011). С. 1–6.
59. Arnold S. E. [и др.]. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums // *Nature Reviews Neurology*. 2018. № 3 (14). С. 168–181.

60. Arvanitakis Z., Wilson R. S., Bennett D. A. Diabetes mellitus, dementia, and cognitive function in older persons // *The Journal of Nutrition, Health & Aging*. 2006. № 4 (10). С. 287–291.
61. Ashraf A. [и др.]. Cortical hypermetabolism in MCI subjects: a compensatory mechanism? // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015. № 3 (42). С. 447–458.
62. Atlante A. [и др.]. A disease with a sweet tooth: exploring the Warburg effect in Alzheimer's disease // *Biogerontology*. 2017. № 3 (18). С. 301–319.
63. Attems J. [и др.]. Capillary CAA and perivascular A β -deposition: Two distinct features of Alzheimer's disease pathology // *Journal of the Neurological Sciences*. 2010. № 1–2 (299). С. 155–162.
64. Attwell D., Laughlin S. B. An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2001. № 10 (21). С. 1133–1145.
65. Audesse A. J. [и др.]. FOXO3 directly regulates an autophagy network to functionally regulate proteostasis in adult neural stem cells // *PLOS Genetics*. 2019. № 4 (15). С. e1008097.
66. Auriel E., Greenberg S. M. The Pathophysiology and Clinical Presentation of Cerebral Amyloid Angiopathy // *Current Atherosclerosis Reports*. 2012. № 4 (14). С. 343–350.
67. Aviello G. [и др.]. Anti-proliferative effect of rhein, an anthraquinone isolated from *Cassia* species, on Caco-2 human adenocarcinoma cells // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010. № 7 (14). С. 2006–2014.
68. Azcárraga-Guirola E. [и др.]. Electrophysiological correlates of decision making impairment in multiple sclerosis // *European Journal of Neuroscience*. 2017. № 2 (45). С. 321–329.
69. Azzinnari D. [и др.]. Mouse social stress induces increased fear conditioning, helplessness and fatigue to physical challenge together with markers of altered immune and dopamine function // *Neuropharmacology*. 2014. (85). С. 328–341.

70. Baglietto-Vargas D. [и др.]. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2016. (64). С. 272–287.
71. Bagyinszky E. [и др.]. PSEN1 L226F mutation in a patient with early-onset Alzheimer's disease in Korea // *Clinical Interventions in Aging*. 2016. (Volume 11). С. 1433–1440.
72. Bak L. K., Schousboe A., Waagepetersen H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer // *Journal of Neurochemistry*. 2006. № 3 (98). С. 641–653.
73. Baki L. [и др.]. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations // *The EMBO Journal*. 2004. № 13 (23). С. 2586–2596.
74. Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer: Hypoxia, Inflammation, and Cancer // *International Journal of Cancer*. 2016. № 5 (138). С. 1058–1066.
75. Baleriola J. [и др.]. Axonally Synthesized ATF4 Transmits a Neurodegenerative Signal across Brain Regions // *Cell*. 2014. № 5 (158). С. 1159–1172.
76. Banks W. A. [и др.]. Transport of Insulin Across the Blood-Brain Barrier: Saturability at Euglycemic Doses of Insulin // *Peptides*. 1997. № 9 (18). С. 1423–1429.
77. Banks W. A., Jaspan J. B., Kastin A. J. Effect of Diabetes Mellitus on the Permeability of the Blood–Brain Barrier to Insulin // *Peptides*. 1997. № 10 (18). С. 1577–1584.
78. Banks W. A., Jaspan J. B., Kastin A. J. Selective, Physiological Transport of Insulin Across the Blood-Brain Barrier: Novel Demonstration by Species-Specific Radioimmunoassays // *Peptides*. 1997. № 8 (18). С. 1257–1262.
79. Banks W. A., Kastin A. J. Differential Permeability of the Blood–Brain Barrier to Two Pancreatic Peptides: Insulin and Amylin // *Peptides*. 1998. № 5 (19). С. 883–889.

80. Banks W. A., Owen J. B., Erickson M. A. Insulin in the brain: There and back again // *Pharmacology & Therapeutics*. 2012. № 1 (136). С. 82–93.
81. Barbagallo A. P. M. [и др.]. Tyr(682) in the intracellular domain of APP regulates amyloidogenic APP processing in vivo // *PloS One*. 2010. № 11 (5). С. e15503.
82. Barone E. [и др.]. Biliverdin Reductase-A Mediates the Beneficial Effects of Intranasal Insulin in Alzheimer Disease // *Molecular Neurobiology*. 2019. № 4 (56). С. 2922–2943.
83. Baskin D. G. [и др.]. Insulin in the brain // *Annual Review of Physiology*. 1987. (49). С. 335–347.
84. Bayard S. [и др.]. Apathy and Emotion-Based Decision-Making in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease // *Behavioural Neurology*. 2014. (2014). С. 1–7.
85. Beal M. F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1998. № 1–2 (1366). С. 211–223.
86. Bedrosian T. A. [и др.]. Altered temporal patterns of anxiety in aged and amyloid precursor protein (APP) transgenic mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. № 28 (108). С. 11686–11691.
87. Behl C. Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease // *Cell and Tissue Research*. 1997. № 3 (290). С. 471–480.
88. Bélanger M., Allaman I., Magistretti P. J. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation // *Cell Metabolism*. 2011. № 6 (14). С. 724–738.
89. Belfiore R. [и др.]. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice // *Aging Cell*. 2019. № 1 (18). С. e12873.
90. Bell R. D., Zlokovic B. V. Neurovascular mechanisms and blood–brain barrier disorder in Alzheimer's disease // *Acta Neuropathologica*. 2009. № 1 (118). С. 103–113.

91. Benarroch E. E. Brain glucose transporters: implications for neurologic disease // *Neurology*. 2014. № 15 (82). С. 1374–1379.
92. Bero A. W. [и др.]. Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- β deposition // *Nature Neuroscience*. 2011. № 6 (14). С. 750–756.
93. Bharadwaj P. [и др.]. The Link between Type 2 Diabetes and Neurodegeneration: Roles for Amyloid- β , Amylin, and Tau Proteins // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017. № 2 (59). С. 421–432.
94. Biessels G. J., Reagan L. P. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction // *Nature Reviews Neuroscience*. 2015. № 11 (16). С. 660–671.
95. Billings L. M. [и др.]. Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice // *Neuron*. 2005. № 5 (45). С. 675–688.
96. Bingham E. M. [и др.]. The Role of Insulin in Human Brain Glucose Metabolism: An 18Fluoro-Deoxyglucose Positron Emission Tomography Study // *Diabetes*. 2002. № 12 (51). С. 3384–3390.
97. Biron K. E. [и др.]. Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease // *PLoS ONE*. 2011. № 8 (6). С. e23789.
98. Blázquez E. [и др.]. Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease // *Frontiers in Endocrinology*. 2014. (5).
99. Blázquez E. [и др.]. Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease // *Frontiers in Endocrinology*. 2014. (5).
100. Blennow K., Leon M. J. de, Zetterberg H. Alzheimer's disease // *The Lancet*. 2006. № 9533 (368). С. 387–403.
101. Bloom G. S. Amyloid- β and Tau: The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis // *JAMA Neurology*. 2014. № 4 (71). С. 505.
102. Bobich J. A., Zheng Q., Campbell A. Incubation of nerve endings with a physiological concentration of A β 1-42 activates CaV2.2(N-Type)-voltage operated

calcium channels and acutely increases glutamate and noradrenaline release // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2004. № 3 (6). С. 243–255.

103. Bolmont T. [и др.]. Induction of Tau Pathology by Intracerebral Infusion of Amyloid- β -Containing Brain Extract and by Amyloid- β Deposition in APP \times Tau Transgenic Mice // *The American Journal of Pathology*. 2007. № 6 (171). С. 2012–2020.

104. Bomfim T. R. [и др.]. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers // *The Journal of Clinical Investigation*. 2012. № 4 (122). С. 1339–1353.

105. Botton P. H. [и др.]. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice // *Behavioural Brain Research*. 2010. № 2 (214). С. 254–259.

106. Boucher J., Kleinridders A., Kahn C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014. № 1 (6). С. a009191–a009191.

107. Bowling A. C. [и др.]. Age-Dependent Impairment of Mitochondrial Function in Primate Brain // *Journal of Neurochemistry*. 1993. № 5 (60). С. 1964–1967.

108. Boyd F. T., Clarke D. W., Raizada M. K. Insulin inhibits specific norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain // *Brain Research*. 1986. № 1 (398). С. 1–5.

109. Boyle P. A. [и др.]. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons // *Neurology*. 2015. № 22 (85). С. 1930–1936.

110. Brant A. M. [и др.]. Immunological Analysis of Glucose Transporters Expressed in Different Regions of the Rat Brain and Central Nervous System // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1993. № 3 (192). С. 1297–1302.

111. Brookmeyer R. [и др.]. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia*. 2007. № 3 (3). С. 186–191.

112. Brown M. F., Farley R. F., Lorek E. J. Remembrance of places you passed: Social spatial working memory in rats. // *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. 2007. № 3 (33). С. 213–224.

113. Brüning J. C. [и др.]. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction // *Science (New York, N.Y.)*. 2000. № 5487 (289). С. 2122–2125.

114. Bulbarelli A. [и др.]. A β 42 production in brain capillary endothelial cells after oxygen and glucose deprivation // *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2012. № 4 (49). С. 415–422.

115. Burgess N., Maguire E. A., O'Keefe J. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory // *Neuron*. 2002. № 4 (35). С. 625–641.

116. Burgmans S. [и др.]. Amyloid- β Interacts with Blood-Brain Barrier Function in Dementia: A Systematic Review // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013. № 4 (35). С. 859–873.

117. Bush A. I. Copper, Zinc, and the Metallobiology of Alzheimer Disease: // *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. 2003. № 3 (17). С. 147–150.

118. Caberlotto L. [и др.]. Cross-disease analysis of Alzheimer's disease and type-2 Diabetes highlights the role of autophagy in the pathophysiology of two highly comorbid diseases // *Scientific Reports*. 2019. № 1 (9). С. 3965.

119. Cai W. [и др.]. Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior // *Journal of Clinical Investigation*. 2018. № 7 (128). С. 2914–2926.

120. Cai Z., Zhao Y., Zhao B. Roles of Glycogen Synthase Kinase 3 in Alzheimer's Disease // *Current Alzheimer Research*. 2012. № 7 (9). С. 864–879.

121. Calvo-Ochoa E., Arias C. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models: Insulin Resistance and Cognitive Decline // *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2015. № 1 (31). С. 1–13.

122. Candeias E. [и др.]. The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease // *IUBMB Life*. 2012. № 12 (64). С. 951–957.

123. Cao X., Südhof T. C. A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60 // *Science*. 2001. № 5527 (293). С. 115–120.

124. Cargnello M., Roux P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011. № 1 (75). С. 50–83.

125. Carlessi L. [и др.]. DNA-damage response, survival and differentiation in vitro of a human neural stem cell line in relation to ATM expression // *Cell Death & Differentiation*. 2009. № 6 (16). С. 795–806.

126. Carobrez A. P., Bertoglio L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005. № 8 (29). С. 1193–1205.

127. Carrano A. [и др.]. Neuroinflammation and Blood-Brain Barrier Changes in Capillary Amyloid Angiopathy // *Neurodegenerative Diseases*. 2012. № 1–4 (10). С. 329–331.

128. Carro E. [и др.]. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels // *Nature Medicine*. 2002. № 12 (8). С. 1390–1397.

129. Caserta M. T. [и др.]. Blood–Brain Barrier Integrity in Alzheimer’s Disease Patients and Elderly Control Subjects // *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 1998. № 1 (10). С. 78–84.

130. Chai S. Y. [и др.]. Development of cognitive enhancers based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase // *BMC Neuroscience*. 2008. № S2 (9). С. S14.

131. Chan E. S. [и др.]. ApoE4 expression accelerates hippocampus-dependent cognitive deficits by enhancing A β impairment of insulin signaling in an Alzheimer’s disease mouse model // *Scientific Reports*. 2016. № 1 (6). С. 26119.

132. Chan E. S. [и др.]. Differential Binding of Human ApoE Isoforms to Insulin Receptor is Associated with Aberrant Insulin Signaling in AD Brain Samples // *NeuroMolecular Medicine*. 2018. № 1 (20). С. 124–132.

133. Chang E. H. [и др.]. AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. № 9 (103). С. 3410–3415.

134. Chapman C. D. [и др.]. Intranasal insulin in Alzheimer's disease: Food for thought // *Neuropharmacology*. 2018. (136). С. 196–201.

135. Chatterjee S. [и др.]. Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia // *Diabetes Care*. 2016. № 2 (39). С. 300–307.

136. Chaudhury D. [и др.]. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons // *Nature*. 2013. № 7433 (493). С. 532–536.

137. Chen F. [и др.]. RAGE-NF- κ B-PPAR γ Signaling is Involved in AGEs-Induced Upregulation of Amyloid- β Influx Transport in an In Vitro BBB Model // *Neurotoxicity Research*. 2018. № 2 (33). С. 284–299.

138. Chen G. [и др.]. A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease // *Nature*. 2000. № 6815 (408). С. 975–979.

139. Chen Q., Kang J., Fu C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018. № 1 (3). С. 18.

140. Chen T.-J. [и др.]. Insulin can induce the expression of a memory-related synaptic protein through facilitating AMPA receptor endocytosis in rat cortical neurons // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014. № 20 (71). С. 4069–4080.

141. Chen W. [и др.]. A β 1-42 induces cell damage via RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress in bEnd.3 cells // *Experimental Cell Research*. 2018. № 1 (362). С. 83–89.

142. Chen Y. [и др.]. Deregulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease // *Neuroscience Bulletin*. 2014. № 2 (30). С. 282–294.

143. Chen Z., Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies // *Progress in Neurobiology*. 2013. (108). C. 21–43.
144. Chetram Deochand M. T. CSF and Brain Indices of Insulin Resistance, Oxidative Stress and Neuro-Inflammation in Early versus Late Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*. 2013. № 04 (03).
145. Cheung C. [и др.]. Modeling Cerebrovascular Pathophysiology in Amyloid- β Metabolism using Neural-Crest-Derived Smooth Muscle Cells // *Cell Reports*. 2014. № 1 (9). C. 391–401.
146. Chishti M. A. [и др.]. Early-onset Amyloid Deposition and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Expressing a Double Mutant Form of Amyloid Precursor Protein 695 // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. № 24 (276). C. 21562–21570.
147. Cho J.-H., Johnson G. V. W. Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules // *Journal of Neurochemistry*. 2004. № 2 (88). C. 349–358.
148. Cholerton B., Baker L. D., Craft S. Insulin resistance and pathological brain ageing: Insulin resistance and brain ageing // *Diabetic Medicine*. 2011. № 12 (28). C. 1463–1475.
149. Cholerton B., Baker L. D., Craft S. Insulin, cognition, and dementia // *European Journal of Pharmacology*. 2013. № 1–3 (719). C. 170–179.
150. Chua L.-M. [и др.]. Impaired Neuronal Insulin Signaling Precedes A β 42 Accumulation in Female A β PPsw/PS1 Δ E9 Mice // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. № 4 (29). C. 783–791.
151. Chui H. C., Ramirez-Gomez L. Clinical and imaging features of mixed Alzheimer and vascular pathologies // *Alzheimer's Research & Therapy*. 2015. № 1 (7). C. 21.
152. Chung J. A., Cummings J. L. NEUROBEHAVIORAL AND NEUROPSYCHIATRIC SYMPTOMS IN ALZHEIMER'S DISEASE // *Neurologic Clinics*. 2000. № 4 (18). C. 829–846.

153. Cirrito J. R. [и др.]. *In Vivo* Assessment of Brain Interstitial Fluid with Microdialysis Reveals Plaque-Associated Changes in Amyloid- β Metabolism and Half-Life // *The Journal of Neuroscience*. 2003. № 26 (23). С. 8844–8853.

154. Clark J. J., Hollon N. G., Phillips P. E. Pavlovian valuation systems in learning and decision making // *Current Opinion in Neurobiology*. 2012. № 6 (22). С. 1054–1061.

155. Clark R. E., Zola S. M., Squire L. R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2000. № 23 (20). С. 8853–8860.

156. Clarke L. E. [и др.]. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. № 8 (115). С. E1896–E1905.

157. Claxton A. [и др.]. Long-Acting Intranasal Insulin Detemir Improves Cognition for Adults with Mild Cognitive Impairment or Early-Stage Alzheimer's Disease Dementia // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. № 3 (44). С. 897–906.

158. Cleret de Langavant L. [и др.]. Approximating dementia prevalence in population-based surveys of aging worldwide: An unsupervised machine learning approach // *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2020. № 1 (6).

159. Cognitive Function and Ageing Studies (CFAS) Collaboration [и др.]. A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies I and II // *Nature Communications*. 2016. № 1 (7). С. 11398.

160. Cole A. R. [и др.]. Molecular connexions between dementia and diabetes // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2007. № 7 (31). С. 1046–1063.

161. Colombo A. [и др.]. JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of Disease*. 2009. № 3 (33). С. 518–525.

162. Copps K. D., White M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2 // *Diabetologia*. 2012. № 10 (55). С. 2565–2582.

163. Corbett B. F. [и др.]. Δ FosB Regulates Gene Expression and Cognitive Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Cell Reports*. 2017. № 2 (20). С. 344–355.
164. Corder E. H. [и др.]. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease // *Nature Genetics*. 1994. № 2 (7). С. 180–184.
165. Correa S. A. L. [и др.]. MSK1 Regulates Homeostatic and Experience-Dependent Synaptic Plasticity // *Journal of Neuroscience*. 2012. № 38 (32). С. 13039–13051.
166. Craft S. [и др.]. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in alzheimer's disease // *Neurobiology of Aging*. 1996. № 1 (17). С. 123–130.
167. Craft S. [и др.]. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: Relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype // *Neurology*. 1998. № 1 (50). С. 164–168.
168. Craft S. The Role of Metabolic Disorders in Alzheimer Disease and Vascular Dementia: Two Roads Converged // *Archives of Neurology*. 2009. № 3 (66).
169. Craft S. Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnestic Mild Cognitive Impairment: A Pilot Clinical Trial // *Archives of Neurology*. 2012. № 1 (69). С. 29.
170. Craft S. [и др.]. Effects of Regular and Long-Acting Insulin on Cognition and Alzheimer's Disease Biomarkers: A Pilot Clinical Trial // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2017. № 4 (57). С. 1325–1334.
171. Craft S. [и др.]. Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial // *JAMA Neurology*. 2020. № 9 (77). С. 1099.
172. Craft S., Cholerton B., Baker L. D. Insulin and Alzheimer's Disease: Untangling the Web // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. № s1 (33). С. S263–S275.

173. Craft S., Stennis Watson G. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms // *The Lancet Neurology*. 2004. № 3 (3). С. 169–178.

174. Creighton S. D. [и др.]. Dissociable cognitive impairments in two strains of transgenic Alzheimer's disease mice revealed by a battery of object-based tests // *Scientific Reports*. 2019. № 1 (9). С. 57.

175. Cruchaga C. [и др.]. Polygenic risk score of sporadic late-onset Alzheimer's disease reveals a shared architecture with the familial and early-onset forms // *Alzheimer's & Dementia*. 2018. № 2 (14). С. 205–214.

176. Cuadrado A., Nebreda A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling // *Biochemical Journal*. 2010. № 3 (429). С. 403–417.

177. Cuadrado-Tejedor M. [и др.]. Enhanced Expression of the Voltage-Dependent Anion Channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's Disease Transgenic Mice: An Insight into the Pathogenic Effects of Amyloid- β // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. № 2 (23). С. 195–206.

178. Cui Y. [и др.]. Altered Spontaneous Brain Activity in Type 2 Diabetes: A Resting-State Functional MRI Study // *Diabetes*. 2014. № 2 (63). С. 749–760.

179. Cummings J. L., Masterman D. L. Assessment of treatment-associated changes in behavior and cholinergic therapy of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease // *The Journal of Clinical Psychiatry*. 1998. (59 Suppl 13). С. 23–30.

180. Cummins N. [и др.]. Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria // *The EMBO Journal*. 2019. № 3 (38).

181. Cusi K. [и др.]. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle // *The Journal of Clinical Investigation*. 2000. № 3 (105). С. 311–320.

182. Daniele S., Giacomelli C., Martini C. Brain ageing and neurodegenerative disease: The role of cellular waste management // *Biochemical Pharmacology*. 2018. (158). С. 207–216.

183. Daulatzai M. A. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease: Cerebral Hypoperfusion and Glucose Hypometabolism Promote Cognitive Dysfunction // *Journal of Neuroscience Research*. 2017. № 4 (95). С. 943–972.

184. Davidson T. L. [и др.]. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats // *Physiology & Behavior*. 2012. № 1 (107). С. 26–33.

185. Davis J. B. Oxidative Mechanisms in β -Amyloid Cytotoxicity // *Neurodegeneration*. 1996. № 4 (5). С. 441–444.

186. De Bundel D. [и др.]. Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2009. № 1 (92). С. 19–26.

187. Deane R. [и др.]. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain // *Nature Medicine*. 2003. № 7 (9). С. 907–913.

188. Deane R. [и др.]. Clearance of Amyloid- β Peptide Across the Blood-Brain Barrier: Implication for Therapies in Alzheimer's Disease // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 2009. № 1 (8). С. 16–30.

189. Deane R. [и др.]. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease // *Journal of Clinical Investigation*. 2012. № 4 (122). С. 1377–1392.

190. Dearth R. K. [и др.]. Oncogenic Transformation by the Signaling Adaptor Proteins Insulin Receptor Substrate (IRS)-1 and IRS-2 // *Cell Cycle*. 2007. № 6 (6). С. 705–713.

191. DeBay D. R. [и др.]. Butyrylcholinesterase-knockout reduces fibrillar β -amyloid and conserves 18FDG retention in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease // *Brain Research*. 2017. (1671). С. 102–110.

192. Delatour B. [и др.]. FE65 in Alzheimer's disease: neuronal distribution and association with neurofibrillary tangles // *The American Journal of Pathology*. 2001. № 5 (158). С. 1585–1591.

193. Delgado M., Varela N., Gonzalez-Rey E. Vasoactive intestinal peptide protects against β -amyloid-induced neurodegeneration by inhibiting microglia activation at multiple levels // *Glia*. 2008. № 10 (56). С. 1091–1103.

194. Demarest T. G. [и др.]. Biological sex and DNA repair deficiency drive Alzheimer's disease via systemic metabolic remodeling and brain mitochondrial dysfunction // *Acta Neuropathologica*. 2020. № 1 (140). С. 25–47.

195. Denny C. A. [и др.]. 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning // *Hippocampus*. 2012. № 5 (22). С. 1188–1201.

196. Denver P., English A., McClean P. L. Inflammation, insulin signaling and cognitive function in aged APP/PS1 mice // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018. (70). С. 423–434.

197. Desai B. S. [и др.]. Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease // *Journal of Neural Transmission*. 2009. № 5 (116). С. 587–597.

198. Devi L., Ohno M. Phospho-eIF2 α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice // *PloS One*. 2010. № 9 (5). С. e12974.

199. Di Paolo G., Kim T.-W. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond // *Nature Reviews Neuroscience*. 2011. № 5 (12). С. 284–296.

200. Diaz A. [и др.]. Metabolic Syndrome Exacerbates the Recognition Memory Impairment and Oxidative-Inflammatory Response in Rats with an Intrahippocampal Injection of Amyloid Beta 1–42 // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. (2018). С. 1–13.

201. Díaz-García C. M. [и др.]. Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake // *Cell Metabolism*. 2017. № 2 (26). С. 361-374.e4.

202. Dickerson B. C., Eichenbaum H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2010. № 1 (35). С. 86–104.
203. Dickstein D. L. [и др.]. A β peptide immunization restores blood-brain barrier integrity in Alzheimer disease // *The FASEB Journal*. 2006. № 3 (20). С. 426–433.
204. Dienel G. A. Fueling and Imaging Brain Activation // *ASN Neuro*. 2012. № 5 (4). С. AN20120021.
205. Ding F. [и др.]. Early Decline in Glucose Transport and Metabolism Precedes Shift to Ketogenic System in Female Aging and Alzheimer's Mouse Brain: Implication for Bioenergetic Intervention // *PLoS ONE*. 2013. № 11 (8). С. e79977.
206. Djordjevic A. [и др.]. Chronic social isolation is related to both upregulation of plasticity genes and initiation of proapoptotic signaling in Wistar rat hippocampus // *Journal of Neural Transmission*. 2009. № 12 (116). С. 1579–1589.
207. Dong W. [и др.]. The mixed-lineage kinase 3 inhibitor URMC-099 facilitates microglial amyloid- β degradation // *Journal of Neuroinflammation*. 2016. № 1 (13). С. 184.
208. Doody R. S. [и др.]. Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease // *New England Journal of Medicine*. 2014. № 4 (370). С. 311–321.
209. Dorszewska J. [и др.]. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease // *Current Alzheimer Research*. 2016. № 9 (13). С. 952–963.
210. Dou J.-T. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning // *Learning & Memory*. 2005. № 6 (12). С. 646–655.
211. Dougherty R. J. [и др.]. Moderate Physical Activity is Associated with Cerebral Glucose Metabolism in Adults at Risk for Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017. № 4 (58). С. 1089–1097.
212. Drachman D. A. [и др.]. Microvascular changes in Down syndrome with Alzheimer's-type pathology: Insights into a potential vascular mechanism for Down

syndrome and Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia*. 2017. № 12 (13). С. 1389–1396.

213. Drouin E., Drouin G. The first report of Alzheimer's disease // *The Lancet Neurology*. 2017. № 9 (16). С. 687.

214. Drummond E., Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality // *Acta Neuropathologica*. 2017. № 2 (133). С. 155–175.

215. Du H. [и др.]. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. № 43 (107). С. 18670–18675.

216. Du H. [и др.]. The Interaction of Amyloid β and the Receptor for Advanced Glycation Endproducts Induces Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Brain Endothelial Cells // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2012. № 1 (32). С. 141–147.

217. Duarte A. I., Moreira P. I., Oliveira C. R. Insulin in Central Nervous System: More than Just a Peripheral Hormone // *Journal of Aging Research*. 2012. (2012). С. 1–21.

218. Eimer W. A., Vassar R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation // *Molecular Neurodegeneration*. 2013. № 1 (8). С. 2.

219. El Messari S. [и др.]. Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system // *The Journal of Comparative Neurology*. 1998. № 4 (399). С. 492–512.

220. Elder G. A., Gama Sosa M. A., De Gasperi R. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: G. A. ELDER ET AL.: TRANSGENIC MODELS AND ALZHEIMER'S DISEASE // *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2010. № 1 (77). С. 69–81.

221. El-Hayek Y. H. [и др.]. Tip of the Iceberg: Assessing the Global Socioeconomic Costs of Alzheimer's Disease and Related Dementias and Strategic Implications for Stakeholders // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019. № 2 (70). С. 323–341.

222. Encinas J. M., Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain // *Methods in Cell Biology*. 2008. (85). C. 243–272.

223. Endo S., Launey T. ERKs regulate PKC-dependent synaptic depression and declustering of glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells // *Neuropharmacology*. 2003. № 6 (45). C. 863–872.

224. Ennaceur A. Omission of the habituation procedure in the acquisition of a working memory task - evidence from Balb/c, C57/BL6J, and CD-1 mice // *Behavioural Brain Research*. 2011. № 1 (223). C. 203–210.

225. Epelbaum S. [и др.]. Acute amnestic encephalopathy in amyloid- β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo // *Neurobiology of Aging*. 2015. № 6 (36). C. 2043–2052.

226. Erickson M. A., Banks W. A. Blood–Brain Barrier Dysfunction as a Cause and Consequence of Alzheimer’s Disease // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013. № 10 (33). C. 1500–1513.

227. Erickson M. A., Dohi K., Banks W. A. Neuroinflammation: A Common Pathway in CNS Diseases as Mediated at the Blood-Brain Barrier // *Neuroimmunomodulation*. 2012. № 2 (19). C. 121–130.

228. Escribano L. [и др.]. Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer’s disease mouse model // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. № 2 (379). C. 406–410.

229. Eslami M., Sadeghi B., Goshadrou F. Chronic ghrelin administration restores hippocampal long-term potentiation and ameliorates memory impairment in rat model of Alzheimer’s disease // *Hippocampus*. 2018. № 10 (28). C. 724–734.

230. Esquerda-Canals G. [и др.]. Mouse Models of Alzheimer’s Disease // *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2017. № 4 (57). C. 1171–1183.

231. Exalto L. G. [и др.]. Risk score for prediction of 10 year dementia risk in individuals with type 2 diabetes: a cohort study // *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2013. № 3 (1). C. 183–190.

232. Faber E. S. L., Callister R. J., Sah P. Morphological and Electrophysiological Properties of Principal Neurons in the Rat Lateral Amygdala In Vitro // *Journal of Neurophysiology*. 2001. № 2 (85). С. 714–723.

233. Fadel J. R., Reagan L. P. Stop signs in hippocampal insulin signaling: the role of insulin resistance in structural, functional and behavioral deficits // *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2016. (9). С. 47–54.

234. Fang E. F. [и др.]. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease // *Nature Neuroscience*. 2019. № 3 (22). С. 401–412.

235. Fang X. [и др.]. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. № 22 (97). С. 11960–11965.

236. Farris W. [и др.]. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. № 7 (100). С. 4162–4167.

237. Fernández-de Frutos M. [и др.]. MicroRNA 7 Impairs Insulin Signaling and Regulates A β Levels through Posttranscriptional Regulation of the Insulin Receptor Substrate 2, Insulin Receptor, Insulin-Degrading Enzyme, and Liver X Receptor Pathway // *Molecular and Cellular Biology*. 2019. № 22 (39). С. e00170-19, /mcb/39/22/MCB.00170-19.atom.

238. Fernando R. N. [и др.]. Distribution and cellular localization of insulin-regulated aminopeptidase in the rat central nervous system // *The Journal of Comparative Neurology*. 2005. № 4 (487). С. 372–390.

239. Fernando R. N., Albiston A. L., Chai S. Y. The insulin-regulated aminopeptidase IRAP is colocalised with GLUT4 in the mouse hippocampus - potential role in modulation of glucose uptake in neurones? // *European Journal of Neuroscience*. 2008. № 3 (28). С. 588–598.

240. Ferrario C. R., Reagan L. P. Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts // *Neuropharmacology*. 2018. (136). С. 182–191.
241. Ferreira de Sá D. S. [и др.]. Effects of intranasal insulin as an enhancer of fear extinction: a randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2020. № 5 (45). С. 753–760.
242. Ferreira S. T. [и др.]. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia*. 2014. (10). С. S76–S83.
243. Ferreira S. T., Klein W. L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2011. № 4 (96). С. 529–543.
244. Figlewicz D. P. [и др.]. Intraventricular insulin increases dopamine transporter mRNA in rat VTA/substantia nigra // *Brain Research*. 1994. № 2 (644). С. 331–334.
245. Figueiredo C. P. [и др.]. Folic Acid Plus α -Tocopherol Mitigates Amyloid- β -Induced Neurotoxicity through Modulation of Mitochondrial Complexes Activity // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. № 1 (24). С. 61–75.
246. Figueiredo C. P. [и др.]. Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight A Oligomers But Not the Persistent Impairment Induced by Low-Molecular-Weight Oligomers // *Journal of Neuroscience*. 2013. № 23 (33). С. 9626–9634.
247. Fitch T. [и др.]. Force transducer-based movement detection in fear conditioning in mice: a comparative analysis // *Hippocampus*. 2002. № 1 (12). С. 4–17.
248. Flanigan T. J. [и др.]. Abnormal vibrissa-related behavior and loss of barrel field inhibitory neurons in 5xFAD transgenics // *Genes, Brain, and Behavior*. 2014. № 5 (13). С. 488–500.

249. Folin M. [и др.]. Caspase-8 activation and oxidative stress are involved in the cytotoxic effect of beta-amyloid on rat brain microvascular endothelial cells // *International Journal of Molecular Medicine*. 2006. № 3 (17). С. 431–435.

250. Fonseca A. C. R. G. [и др.]. Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1–40 peptide in brain endothelial cells // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013. № 12 (1832). С. 2191–2203.

251. Fonseca A. C. R. G. [и др.]. Amyloid-Beta Disrupts Calcium and Redox Homeostasis in Brain Endothelial Cells // *Molecular Neurobiology*. 2015. № 2 (51). С. 610–622.

252. for the ARGO investigators [и др.]. A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. № 1 (45). С. 75–88.

253. Forrest S. L. [и др.]. Retiring the term FTDP-17 as MAPT mutations are genetic forms of sporadic frontotemporal tauopathies // *Brain*. 2018. № 2 (141). С. 521–534.

254. Frank H. J. L. [и др.]. Enhanced Insulin Binding to Blood-Brain Barrier In Vivo and to Brain Microvessels In Vitro in Newborn Rabbits // *Diabetes*. 1985. № 8 (34). С. 728–733.

255. FRANKLIN K. B. J. P. GEORGE PAXINOS AND FRANKLIN'S THE MOUSE BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES: compact 5th edition. / K. B. J. P. FRANKLIN GEORGE, Place of publication not identified: ELSEVIER ACADEMIC Press, 2019.

256. Frautschy S. A. [и др.]. Rodent models of Alzheimer's disease: Rat a β infusion approaches to amyloid deposits // *Neurobiology of Aging*. 1996. № 2 (17). С. 311–321.

257. Frazier H. N. [и др.]. Broadening the definition of brain insulin resistance in aging and Alzheimer's disease // *Experimental Neurology*. 2019. (313). С. 79–87.

258. Freeman L. R., Granholm A.-C. E. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet // *Journal of Cerebral Blood Flow*

and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2012. № 4 (32). С. 643–653.

259. Freir D. B., Holscher C., Herron C. E. Blockade of Long-Term Potentiation by β -Amyloid Peptides in the CA1 Region of the Rat Hippocampus In Vivo // Journal of Neurophysiology. 2001. № 2 (85). С. 708–713.

260. Freude S. [и др.]. Peripheral Hyperinsulinemia Promotes Tau Phosphorylation In Vivo // Diabetes. 2005. № 12 (54). С. 3343–3348.

261. Freude S., Schilbach K., Schubert M. The Role of IGF-1 Receptor and Insulin Receptor Signaling for the Pathogenesis of Alzheimers Disease: From Model Organisms to Human Disease // Current Alzheimer Research. 2009. № 3 (6). С. 213–223.

262. Friedland R. P. [и др.]. Regional Cerebral Metabolic Alterations in Dementia of the Alzheimer Type: Positron Emission Tomography with [1818] Fluorodeoxyglucose // Journal of Computer Assisted Tomography. 1983. № 4 (7). С. 590–598.

263. Frölich L. [и др.]. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease // Journal of Neural Transmission. 1998. № 4 (105). С. 423.

264. Frolich L. [и др.]. A Disturbance in the Neuronal Insulin Receptor Signal Transduction in Sporadic Alzheimer's Disease // Annals of the New York Academy of Sciences. 1999. № 1 OXIDATIVE/ENE (893). С. 290–293.

265. Fujisawa K. [и др.]. Circulating soluble RAGE as a predictive biomarker of cardiovascular event risk in patients with type 2 diabetes // Atherosclerosis. 2013. № 2 (227). С. 425–428.

266. Fujisawa Y., Sasaki K., Akiyama K. Increased insulin levels after OGTT load in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with dementia of Alzheimer type // Biological Psychiatry. 1991. № 12 (30). С. 1219–1228.

267. Games D. [и др.]. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein // Nature. 1995. № 6514 (373). С. 523–527.

268. García-Cabezas M. Á. [и др.]. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features // *Frontiers in Neuroanatomy*. 2016. (10).

269. García-Cáceres C. [и др.]. Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability // *Cell*. 2016. № 4 (166). С. 867–880.

270. Garrido J. L. [и др.]. Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002. № 14 (16). С. 1982–1984.

271. Garwood C. J. [и др.]. Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors // *Molecular Brain*. 2015. № 1 (8). С. 51.

272. Gasparini L. [и др.]. Stimulation of β -Amyloid Precursor Protein Trafficking by Insulin Reduces Intraneuronal β -Amyloid and Requires Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling // *The Journal of Neuroscience*. 2001. № 8 (21). С. 2561–2570.

273. Gatz M. [и др.]. Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease // *Archives of General Psychiatry*. 2006. № 2 (63). С. 168.

274. Ghasemi R. [и др.]. Insulin in the brain: sources, localization and functions // *Molecular Neurobiology*. 2013. № 1 (47). С. 145–171.

275. Giau V. V. [и др.]. APP, PSEN1, and PSEN2 Mutations in Asian Patients with Early-Onset Alzheimer Disease // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. № 19 (20). С. 4757.

276. Gil-Bea F. J. [и др.]. Insulin Levels are Decreased in the Cerebrospinal Fluid of Women with Prodromal Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010. № 2 (22). С. 405–413.

277. Glascher J. [и др.]. Lesion mapping of cognitive control and value-based decision making in the prefrontal cortex // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. № 36 (109). С. 14681–14686.

278. Glenn D. E. [и др.]. The effect of glucose on hippocampal-dependent contextual fear conditioning // *Biological Psychiatry*. 2014. № 11 (75). С. 847–854.
279. Goate A. [и др.]. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease // *Nature*. 1991. № 6311 (349). С. 704–706.
280. Gonçalves R. A. [и др.]. Behavioral Abnormalities in Knockout and Humanized Tau Mice // *Frontiers in Endocrinology*. 2020. (11). С. 124.
281. Götz M. E. [и др.]. Oxidative stress: Free radical production in neural degeneration // *Pharmacology & Therapeutics*. 1994. № 1 (63). С. 37–122.
282. Goustard-Langelier B. [и др.]. Rat neural stem cell proliferation and differentiation are durably altered by the in utero polyunsaturated fatty acid supply // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013. № 1 (24). С. 380–387.
283. Gralle M. The neuronal insulin receptor in its environment // *Journal of Neurochemistry*. 2017. № 3 (140). С. 359–367.
284. Gralle M. [и др.]. Spatial dynamics of the insulin receptor in living neurons // *Journal of Neurochemistry*. 2021. № 1 (156). С. 88–105.
285. Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Journal of Neuroinflammation*. 2011. № 1 (8). С. 26.
286. Gray S. M., Aylor K. W., Barrett E. J. Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell // *Diabetologia*. 2017. № 8 (60). С. 1512–1521.
287. Gray S. M., Barrett E. J. Insulin transport into the brain // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2018. № 2 (315). С. C125–C136.
288. Greenberg S. M. [и др.]. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways // *Nature Reviews Neurology*. 2020. № 1 (16). С. 30–42.
289. Greenberg S. M., Rosand J. Outcome markers for clinical trials in cerebral amyloid angiopathy // *Amyloid: The International Journal of Experimental and*

Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis. 2001. (8 Suppl 1). С. 56–60.

290. Griffin R. J. [и др.]. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology // *Journal of Neurochemistry*. 2005. № 1 (93). С. 105–117.

291. Griffith C. M. [и др.]. Impaired Glucose Tolerance and Reduced Plasma Insulin Precede Decreased AKT Phosphorylation and GLUT3 Translocation in the Hippocampus of Old 3xTg-AD Mice // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019. № 2 (68). С. 809–837.

292. Grillo C. A. [и др.]. Downregulation of hypothalamic insulin receptor expression elicits depressive-like behaviors in rats // *Behavioural Brain Research*. 2011. № 1 (222). С. 230–235.

293. Grillo C. A. [и др.]. Obesity/hyperleptinemic phenotype impairs structural and functional plasticity in the rat hippocampus // *Physiology & Behavior*. 2011. № 1 (105). С. 138–144.

294. Grillo C. A. [и др.]. Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity // *Diabetes*. 2015. № 11 (64). С. 3927–3936.

295. Grillo C. A. [и др.]. Insulin resistance and hippocampal dysfunction: Disentangling peripheral and brain causes from consequences // *Experimental Neurology*. 2019. (318). С. 71–77.

296. Grimm A., Friedland K., Eckert A. Mitochondrial dysfunction: the missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease // *Biogerontology*. 2016. № 2 (17). С. 281–296.

297. Grinberg L. T., Korczyn A. D., Heinsen H. Cerebral amyloid angiopathy impact on endothelium // *Experimental Gerontology*. 2012. № 11 (47). С. 838–842.

298. Gu Y. [и др.]. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 protects PC12 cells from amyloid beta-induced neurotoxicity // *Neural Regeneration Research*. 2018. № 10 (13). С. 1842.

299. Gu Z., Liu W., Yan Z. β -Amyloid Impairs AMPA Receptor Trafficking and Function by Reducing Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Synaptic Distribution // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. № 16 (284). C. 10639–10649.

300. Gual P., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J.-F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation // *Biochimie*. 2005. № 1 (87). C. 99–109.

301. Guo S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms // *Journal of Endocrinology*. 2014. № 2 (220). C. T1–T23.

302. Guo S. [и др.]. Identifying subtypes of mild cognitive impairment from healthy aging based on multiple cortical features combined with volumetric measurements of the hippocampal subfields // *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2020. № 7 (10). C. 1477–1489.

303. Guo X. [и др.]. Correlation of CD34⁺ cells with Tissue Angiogenesis after Traumatic Brain Injury in a Rat Model // *Journal of Neurotrauma*. 2009. C. 090330061141047.

304. Gyurkó M. D. [и др.]. Multitarget network strategies to influence memory and forgetting: the Ras/MAPK pathway as a novel option // *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2015. № 8 (15). C. 696–704.

305. Haapasalo A., Kovacs D. M. The Many Substrates of Presenilin/ γ -Secretase // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. № 1 (25). C. 3–28.

306. Haier R. J. [и др.]. Temporal cortex hypermetabolism in Down syndrome prior to the onset of dementia // *Neurology*. 2003. № 12 (61). C. 1673–1679.

307. Haj-ali V., Mohaddes G., Babri S. H. Intracerebroventricular insulin improves spatial learning and memory in male Wistar rats. // *Behavioral Neuroscience*. 2009. № 6 (123). C. 1309–1314.

308. Hall J., Thomas K. L., Everitt B. J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual

memories // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2001. № 6 (21). С. 2186–2193.

309. Hämäläinen A. [и др.]. Increased fMRI responses during encoding in mild cognitive impairment // *Neurobiology of Aging*. 2007. № 12 (28). С. 1889–1903.

310. Hamilton P. J. [и др.]. Stereotaxic Surgery and Viral Delivery of Zinc-Finger Epigenetic Editing Tools in Rodent Brain *Methods in Molecular Biology* / под ред. J. Liu, New York, NY: Springer New York, 2018. С. 229–238.

311. Han J. [и др.]. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells // *Science*. 1994. № 5173 (265). С. 808–811.

312. Hanger D. P., Noble W. Functional Implications of Glycogen Synthase Kinase-3-Mediated Tau Phosphorylation // *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. (2011). С. 1–11.

313. Hanke S., Mann M. The Phosphotyrosine Interactome of the Insulin Receptor Family and Its Substrates IRS-1 and IRS-2 // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2009. № 3 (8). С. 519–534.

314. Hardy J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics // *Science*. 2002. № 5580 (297). С. 353–356.

315. Harris R. A. [и др.]. Aerobic Glycolysis in the Frontal Cortex Correlates with Memory Performance in Wild-Type Mice But Not the APP/PS1 Mouse Model of Cerebral Amyloidosis // *The Journal of Neuroscience*. 2016. № 6 (36). С. 1871–1878.

316. Harris R. A., Tindale L., Cumming R. C. Age-dependent metabolic dysregulation in cancer and Alzheimer's disease // *Biogerontology*. 2014. № 6 (15). С. 559–577.

317. Hartz A. M. S. [и др.]. Amyloid- β contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy // *Stroke*. 2012. № 2 (43). С. 514–523.

318. Hashimoto Y. [и др.]. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death: JNK in amyloid precursor protein neurotoxicity // *Journal of Neurochemistry*. 2003. № 4 (84). С. 864–877.

319. Hauptmann S. [и др.]. Mitochondrial dysfunction: An early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice // *Neurobiology of Aging*. 2009. № 10 (30). С. 1574–1586.

320. Havrankova J. [и др.]. Identification of insulin in rat brain. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978. № 11 (75). С. 5737–5741.

321. Havrankova J., Roth J., Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat // *Nature*. 1978. № 5656 (272). С. 827–829.

322. Hayden Type 2 Diabetes Mellitus Increases The Risk of Late-Onset Alzheimer's Disease: Ultrastructural Remodeling of the Neurovascular Unit and Diabetic Gliopathy // *Brain Sciences*. 2019. № 10 (9). С. 262.

323. Heide L. P. van der [и др.]. Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner // *Journal of Neurochemistry*. 2005. № 4 (94). С. 1158–1166.

324. Heide L. P. van der, Ramakers G. M. J., Smidt M. P. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive // *Progress in Neurobiology*. 2006. № 4 (79). С. 205–221.

325. Heijer T. den [и др.]. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI // *Diabetologia*. 2003. № 12 (46). С. 1604–1610.

326. Heni M. [и др.]. Insulin Promotes Glycogen Storage and Cell Proliferation in Primary Human Astrocytes // *PLoS ONE*. 2011. № 6 (6). С. e21594.

327. Heras-Sandoval D., Avila-Muñoz E., Arias C. The Phosphatidylinositol 3-Kinase/mTor Pathway as a Therapeutic Target for Brain Aging and Neurodegeneration // *Pharmaceuticals*. 2011. № 8 (4). С. 1070–1087.

328. Héraud C. [и др.]. Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice // *Neurobiology of Disease*. 2014. (62). С. 100–112.

329. Herholz K. Cerebral glucose metabolism in preclinical and prodromal Alzheimer's disease // *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010. № 11 (10). С. 1667–1673.
330. Hermann D. [и др.]. Synthetic A β oligomers (A β 1–42 globulomer) modulate presynaptic calcium currents: Prevention of A β -induced synaptic deficits by calcium channel blockers // *European Journal of Pharmacology*. 2013. № 1–3 (702). С. 44–55.
331. Hernandez F., Lucas J. J., Avila J. GSK3 and Tau: Two Convergence Points in Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. № s1 (33). С. S141–S144.
332. Hersom M. [и др.]. The insulin receptor is expressed and functional in cultured blood-brain barrier endothelial cells but does not mediate insulin entry from blood to brain // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2018. № 4 (315). С. E531–E542.
333. Hertz L., Zielke H. R. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show // *Trends in Neurosciences*. 2004. № 12 (27). С. 735–743.
334. Hertz J. [и др.]. Changes in cerebrospinal fluid and blood plasma levels of IGF-II and its binding proteins in Alzheimer's disease: an observational study // *BMC Neurology*. 2014. № 1 (14). С. 64.
335. Hettinger J. C. [и др.]. AMPA-ergic regulation of amyloid- β levels in an Alzheimer's disease mouse model // *Molecular Neurodegeneration*. 2018. № 1 (13). С. 22.
336. Hirvonen J. [и др.]. Effects of Insulin on Brain Glucose Metabolism in Impaired Glucose Tolerance // *Diabetes*. 2011. № 2 (60). С. 443–447.
337. Hitti F. L., Siegelbaum S. A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory // *Nature*. 2014. № 7494 (508). С. 88–92.
338. Hoey S. E. [и др.]. AMPA Receptor Activation Promotes Non-Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing and Suppresses Neuronal Amyloid- β Production // *PLoS ONE*. 2013. № 10 (8). С. e78155.

339. Hofmann J. [и др.]. Sterubin: Enantioresolution and Configurational Stability, Enantiomeric Purity in Nature, and Neuroprotective Activity in Vitro and in Vivo // *Chemistry – A European Journal*. 2020. № 32 (26). С. 7299–7308.

340. Højlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance // *Danish Medical Journal*. 2014. № 7 (61). С. B4890.

341. Holcomb L. [и др.]. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes // *Nature Medicine*. 1998. № 1 (4). С. 97–100.

342. Holland W. L. [и др.]. Lipid mediators of insulin resistance // *Nutrition Reviews*. 2007. № 6 Pt 2 (65). С. S39-46.

343. Hölscher C. Brain insulin resistance: role in neurodegenerative disease and potential for targeting // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2020. № 4 (29). С. 333–348.

344. Hong M., Lee V. M. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons // *The Journal of Biological Chemistry*. 1997. № 31 (272). С. 19547–19553.

345. Hongpaisan J. [и др.]. PKC activation during training restores mushroom spine synapses and memory in the aged rat // *Neurobiology of Disease*. 2013. (55). С. 44–62.

346. Hori K. NMDA Receptor-Dependent Synaptic Translocation of Insulin Receptor Substrate p53 via Protein Kinase C Signaling // *Journal of Neuroscience*. 2005. № 10 (25). С. 2670–2681.

347. Hort J. [и др.]. Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. № 10 (104). С. 4042–4047.

348. Howarth C., Gleeson P., Attwell D. Updated Energy Budgets for Neural Computation in the Neocortex and Cerebellum // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012. № 7 (32). С. 1222–1232.

349. Hoyer S. The young-adult and normally aged brain. Its blood flow and oxidative metabolism. A review - part I // *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 1982. № 2 (1). С. 101–116.
350. Hoyer S. [и др.]. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000. (920). С. 256–258.
351. Hoyer S. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update // *Journal of Neural Transmission*. 2002. № 3 (109). С. 341–360.
352. Hoyer S. The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review // *Journal of Neural Transmission*. 2002. № 7–8 (109). С. 991–1002.
353. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease // *European Journal of Pharmacology*. 2004. № 1–3 (490). С. 115–125.
354. Hsiao K. [и др.]. Correlative Memory Deficits, A Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice // *Science*. 1996. № 5284 (274). С. 99–103.
355. Hsiao Y.-H., Chang C.-H., Gean P.-W. Impact of social relationships on Alzheimer's memory impairment: mechanistic studies // *Journal of Biomedical Science*. 2018. № 1 (25). С. 3.
356. Hsieh H. [и др.]. AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss // *Neuron*. 2006. № 5 (52). С. 831–843.
357. Hu H. [и др.]. A Mitocentric View of Alzheimer's Disease // *Molecular Neurobiology*. 2017. № 8 (54). С. 6046–6060.
358. Hu Y. [и др.]. Tau accumulation impairs mitophagy *via* increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin // *Oncotarget*. 2016. № 14 (7). С. 17356–17368.
359. Hu Y., Russek S. J. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation // *Journal of Neurochemistry*. 2008. № 1 (105). С. 1–17.

360. Huang C.-C., Lee C.-C., Hsu K.-S. The role of insulin receptor signaling in synaptic plasticity and cognitive function // *Chang Gung Medical Journal*. 2010. № 2 (33). С. 115–125.

361. Huang H. [и др.]. Isolation Housing Exacerbates Alzheimer's Disease-Like Pathophysiology in Aged APP/PS1 Mice // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2015. № 7 (18). С. pyu116–pyu116.

362. Huang S.-M. [и др.]. Neprilysin-sensitive Synapse-associated Amyloid- β Peptide Oligomers Impair Neuronal Plasticity and Cognitive Function* // *Journal of Biological Chemistry*. 2006. № 26 (281). С. 17941–17951.

363. Huber C. M. [и др.]. Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2018. № 1 (61). С. 265–281.

364. Huijbers W. [и др.]. Amyloid Deposition Is Linked to Aberrant Entorhinal Activity among Cognitively Normal Older Adults // *Journal of Neuroscience*. 2014. № 15 (34). С. 5200–5210.

365. Hunt A. [и др.]. Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease // *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2007. № 2 (155). С. 147–154.

366. Hurtado D. E. [и др.]. Selectively Silencing GSK-3 Isoforms Reduces Plaques and Tangles in Mouse Models of Alzheimer's Disease // *Journal of Neuroscience*. 2012. № 21 (32). С. 7392–7402.

367. Hüttenrauch M. [и др.]. Neprilysin Deficiency Alters the Neuropathological and Behavioral Phenotype in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. № 4 (44). С. 1291–1302.

368. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease // *Nature Reviews Neuroscience*. 2004. № 5 (5). С. 347–360.

369. Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia // *Acta Neuropathologica*. 2010. № 3 (120). С. 287–296.

370. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease // *Neuron*. 2017. № 1 (96). С. 17–42.

371. Iannelli F. [и др.]. A damaged genome's transcriptional landscape through multilayered expression profiling around in situ-mapped DNA double-strand breaks // *Nature Communications*. 2017. № 1 (8). С. 15656.

372. Poun P. [и др.]. Investigating the role of P38, JNK and ERK in LPS induced hippocampal insulin resistance and spatial memory impairment: effects of insulin treatment // *EXCLI Journal*; 17:Doc825; ISSN 1611-2156. 2018.

373. Isagawa T. [и др.]. Dual effects of PKNalpha and protein kinase C on phosphorylation of tau protein by glycogen synthase kinase-3beta // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000. № 1 (273). С. 209–212.

374. Ismail M.-A.-M. [и др.]. 27-Hydroxycholesterol impairs neuronal glucose uptake through an IRAP/GLUT4 system dysregulation // *Journal of Experimental Medicine*. 2017. № 3 (214). С. 699–717.

375. Itoh A. [и др.]. Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of β -amyloid-infused rats // *European Journal of Pharmacology*. 1999. № 3 (382). С. 167–175.

376. Jafari Z. [и др.]. Prenatal noise stress aggravates cognitive decline and the onset and progression of beta amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of Aging*. 2019. (77). С. 66–86.

377. Jaffar S. [и др.]. Neuropathology of Mice Carrying Mutant APP^{swe} and/or PS1^{M146L} Transgenes: Alterations in the p75^{NTR} Cholinergic Basal Forebrain Septohippocampal Pathway // *Experimental Neurology*. 2001. № 2 (170). С. 227–243.

378. Jais A., Brüning J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease // *The Journal of Clinical Investigation*. 2017. № 1 (127). С. 24–32.

379. Jawhar S. [и др.]. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of Aging*. 2012. № 1 (33). С. 196.e29-196.e40.

380. Jaworski T., Banach-Kasper E., Gralec K. GSK-3 β at the Intersection of Neuronal Plasticity and Neurodegeneration // *Neural Plasticity*. 2019. (2019). С. 1–14.

381. Jean Y. Y. [и др.]. Caspase-2 is essential for c-Jun transcriptional activation and Bim induction in neuron death // *Biochemical Journal*. 2013. № 1 (455). С. 15–25.

382. Jean Y. Y. [и др.]. Stereotaxic Infusion of Oligomeric Amyloid-beta into the Mouse Hippocampus // *Journal of Visualized Experiments*. 2015. № 100. С. 52805.

383. Jhoо J. H. [и др.]. β -Amyloid (1–42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex // *Behavioural Brain Research*. 2004. № 2 (155). С. 185–196.

384. Jimenez J. C. [и др.]. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit // *Neuron*. 2018. № 3 (97). С. 670-683.e6.

385. Johnson E. C. B. [и др.]. Behavioral and neural network abnormalities in human APP transgenic mice resemble those of App knock-in mice and are modulated by familial Alzheimer's disease mutations but not by inhibition of BACE1 // *Molecular Neurodegeneration*. 2020. № 1 (15). С. 53.

386. Johnson G. V. W. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction // *Journal of Cell Science*. 2004. № 24 (117). С. 5721–5729.

387. Jolivalт C. G. [и др.]. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: Parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin // *Journal of Neuroscience Research*. 2008. № 15 (86). С. 3265–3274.

388. Jolivalт C. G. [и др.]. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice // *Experimental Neurology*. 2010. № 2 (223). С. 422–431.

389. Jordens I. [и др.]. Insulin-regulated Aminopeptidase Is a Key Regulator of GLUT4 Trafficking by Controlling the Sorting of GLUT4 from Endosomes to

Specialized Insulin-regulated Vesicles // *Molecular Biology of the Cell*. 2010. № 12 (21). С. 2034–2044.

390. Josephs K. A. [и др.]. Apolipoprotein E ϵ 4 Is a Determinant for Alzheimer-Type Pathologic Features in Tauopathies, Synucleinopathies, and Frontotemporal Degeneration // *Archives of Neurology*. 2004. № 10 (61). С. 1579.

391. Jurcovicova J. Glucose transport in brain – effect of inflammation // *Endocrine Regulations*. 2014. № 01 (48). С. 35–48.

392. Kahn A. M. [и др.]. Insulin Acutely Inhibits Cultured Vascular Smooth Muscle Cell Contraction by a Nitric Oxide Synthase–Dependent Pathway // *Hypertension*. 1997. № 4 (30). С. 928–933.

393. Kalaria R. N. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer’s disease // *Acta Neuropathologica*. 2016. № 5 (131). С. 659–685.

394. Kalaria R. N., Hedera P. Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer’s disease: // *NeuroReport*. 1995. № 3 (6). С. 477–480.

395. Kalaria R. N., Pax A. B. Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer’s disease // *Brain Research*. 1995. № 1–2 (705). С. 349–352.

396. Kalinowska A., Losy J. PECAM-1, a key player in neuroinflammation // *European Journal of Neurology*. 2006. № 12 (13). С. 1284–1290.

397. Kamal A. [и др.]. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing β -secretase and presenilin-1 requires APP // *Nature*. 2001. № 6864 (414). С. 643–648.

398. Kamal A. [и др.]. Hyperinsulinemia in rats causes impairment of spatial memory and learning with defects in hippocampal synaptic plasticity by involvement of postsynaptic mechanisms // *Experimental Brain Research*. 2013. № 1 (226). С. 45–51.

399. Kandimalla K. K. [и др.]. Mechanism of Neuronal versus Endothelial Cell Uptake of Alzheimer’s Disease Amyloid β Protein // *PLoS ONE*. 2009. № 2 (4). С. e4627.

400. Kandimalla R., Reddy P. H. Multiple faces of dynamin-related protein 1 and its role in Alzheimer's disease pathogenesis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016. № 4 (1862). С. 814–828.

401. Kandimalla R., Thirumala V., Reddy P. H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal // *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2017. № 5 (1863). С. 1078–1089.

402. Kano Y. [и др.]. Osmotic shock-induced neurite extension via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and CREB // *Brain Research*. 2007. (1154). С. 1–7.

403. Kapogiannis D. [и др.]. Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease // *The FASEB Journal*. 2015. № 2 (29). С. 589–596.

404. Kar S., Chabot J.-G., Quirion R. Quantitative autoradiographic localization of [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II, and [125I]insulin receptor binding sites in developing and adult rat brain // *The Journal of Comparative Neurology*. 1993. № 3 (333). С. 375–397.

405. Karelina K. [и др.]. MSK1 regulates environmental enrichment-induced hippocampal plasticity and cognitive enhancement // *Learning & Memory*. 2012. № 11 (19). С. 550–560.

406. Katakam P. V. G. [и др.]. Cerebrovascular Responses to Insulin in Rats // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2009. № 12 (29). С. 1955–1967.

407. Katusic Z. S., Austin S. A. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind // *European Heart Journal*. 2014. № 14 (35). С. 888–894.

408. Kawai M. [и др.]. Degeneration of vascular muscle cells in cerebral amyloid angiopathy of Alzheimer disease // *Brain Research*. 1993. № 1 (623). С. 142–146.

409. Kellar D., Craft S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches // *The Lancet Neurology*. 2020. № 9 (19). С. 758–766.

410. Keller S. R., Davis A. C., Clairmont K. B. Mice Deficient in the Insulin-regulated Membrane Aminopeptidase Show Substantial Decreases in Glucose Transporter GLUT4 Levels but Maintain Normal Glucose Homeostasis // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. № 20 (277). С. 17677–17686.
411. Kelley B. J., Petersen R. C. Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment // *Neurologic Clinics*. 2007. № 3 (25). С. 577–609.
412. Kern W. [и др.]. Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans // *Neuroendocrinology*. 2001. № 4 (74). С. 270–280.
413. Kesavapany S. [и др.]. Expression of the Fe65 adapter protein in adult and developing mouse brain // *Neuroscience*. 2002. № 3 (115). С. 951–960.
414. Ketterer C. [и др.]. Insulin sensitivity of the human brain // *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011. (93). С. S47–S51.
415. Kianpour Rad S. [и др.]. Mechanism involved in insulin resistance via accumulation of β -amyloid and neurofibrillary tangles: link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease // *Drug Design, Development and Therapy*. 2018. (Volume 12). С. 3999–4021.
416. Kim B. [и др.]. The effects of insulin and insulin-like growth factor I on amyloid precursor protein phosphorylation in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease // *Neurobiology of Disease*. 2019. (132). С. 104541.
417. Kim B., Feldman E. L. Insulin resistance in the nervous system // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2012. № 3 (23). С. 133–141.
418. Kim H. Y. [и др.]. Intracerebroventricular Injection of Amyloid- β Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits // *Journal of Visualized Experiments*. 2016. № 109. С. 53308.
419. Kim J.-H. [и др.]. Use-Dependent Effects of Amyloidogenic Fragments of β -Amyloid Precursor Protein on Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus *In Vivo* // *The Journal of Neuroscience*. 2001. № 4 (21). С. 1327–1333.
420. Kim M.-H. [и др.]. Enhanced NMDA receptor-mediated synaptic transmission, enhanced long-term potentiation, and impaired learning and memory in

mice lacking IRSp53 // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2009. № 5 (29). С. 1586–1595.

421. King G., Johnson S. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells // *Science*. 1985. № 4694 (227). С. 1583–1586.

422. King G. L., Park K., Li Q. Selective Insulin Resistance and the Development of Cardiovascular Diseases in Diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture // *Diabetes*. 2016. № 6 (65). С. 1462–1471.

423. Kinner A. [и др.]. -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin // *Nucleic Acids Research*. 2008. № 17 (36). С. 5678–5694.

424. Kirouac L. [и др.]. Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease // *eneuro*. 2017. № 2 (4). С. ENEURO.0149-16.2017.

425. Kishimoto Y. [и др.]. Early Contextual Fear Memory Deficits in a Double-Transgenic Amyloid- β Precursor Protein/Presenilin 2 Mouse Model of Alzheimer's Disease // *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2017. (2017). С. 1–7.

426. Kitazawa M., Medeiros R., M. LaFerla F. Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease: Developing a Better Model as a Tool for Therapeutic Interventions // *Current Pharmaceutical Design*. 2012. № 8 (18). С. 1131–1147.

427. Kleinridders A. [и др.]. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function // *Diabetes*. 2014. № 7 (63). С. 2232–2243.

428. Kleinridders A. [и др.]. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. № 11 (112). С. 3463–3468.

429. Klingner M. [и др.]. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with β -amyloid plaque pathology // *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2003. № 7 (21). С. 357–369.

430. Knezovic A. [и др.]. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease // *Neuropharmacology*. 2018. (135). С. 48–62.
431. Knopman D. S. [и др.]. Vascular risk factors and longitudinal changes on brain MRI: The ARIC study // *Neurology*. 2011. № 22 (76). С. 1879–1885.
432. Kobayashi D. T., Chen K. S. Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease // *Genes, Brain and Behavior*. 2005. № 3 (4). С. 173–196.
433. Koekkoek P. S. [и др.]. Cognitive function in patients with diabetes mellitus: guidance for daily care // *The Lancet Neurology*. 2015. № 3 (14). С. 329–340.
434. Komada M., Takao K., Miyakawa T. Elevated plus maze for mice // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2008. № 22.
435. Konishi M. [и др.]. Endothelial insulin receptors differentially control insulin signaling kinetics in peripheral tissues and brain of mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. № 40 (114). С. E8478–E8487.
436. Könnner A. C. [и др.]. Role for Insulin Signaling in Catecholaminergic Neurons in Control of Energy Homeostasis // *Cell Metabolism*. 2011. № 6 (13). С. 720–728.
437. Kook S.-Y. [и др.]. A 1-42-RAGE Interaction Disrupts Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier Via Ca²⁺-Calcineurin Signaling // *Journal of Neuroscience*. 2012. № 26 (32). С. 8845–8854.
438. Korenić A. [и др.]. Astrocytic Mitochondrial Membrane Hyperpolarization following Extended Oxygen and Glucose Deprivation // *PLoS ONE*. 2014. № 2 (9). С. e90697.
439. Korol S. V. [и др.]. Insulin enhances GABA_A receptor-mediated inhibitory currents in rat central amygdala neurons // *Neuroscience Letters*. 2018. (671). С. 76–81.

440. Kosel F. [и др.]. Age-related changes in social behaviours in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease // *Behavioural Brain Research*. 2019. (362). С. 160–172.
441. Kothari V. [и др.]. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2017. № 2 (1863). С. 499–508.
442. Kremerskothen J. [и др.]. Insulin-induced expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC) in human neuroblastoma cells requires p21ras, mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase and src tyrosine kinases but is protein kinase C-independent // *Neuroscience Letters*. 2002. № 3 (321). С. 153–156.
443. Kruse M. S., Suarez L. G., Coirini H. Regulation of the expression of LXR in rat hypothalamic and hippocampal explants // *Neuroscience Letters*. 2017. (639). С. 53–58.
444. Kulas J. A., Weigel T. K., Ferris H. A. Insulin resistance and impaired lipid metabolism as a potential link between diabetes and Alzheimer's disease // *Drug Development Research*. 2020. № 2 (81). С. 194–205.
445. Kuleshkaya N., Voikar V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light–dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure // *Physiology & Behavior*. 2014. (133). С. 30–38.
446. Kullmann S. [и др.]. Insulin Action in the Human Brain: Evidence from Neuroimaging Studies // *Journal of Neuroendocrinology*. 2015. № 6 (27). С. 419–423.
447. Kullmann S. [и др.]. Selective Insulin Resistance in Homeostatic and Cognitive Control Brain Areas in Overweight and Obese Adults // *Diabetes Care*. 2015. № 6 (38). С. 1044–1050.
448. Kullmann S. [и др.]. Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans // *Physiological Reviews*. 2016. № 4 (96). С. 1169–1209.

449. Kulstad J. J. [и др.]. Differential modulation of plasma β -amyloid by insulin in patients with Alzheimer disease // *Neurology*. 2006. № 10 (66). С. 1506–1510.
450. Kuznetsova E., Schliebs R. β -Amyloid, Cholinergic Transmission, and Cerebrovascular System - A Developmental Study in a Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Current Pharmaceutical Design*. 2013. № 38 (19). С. 6749–6765.
451. Labouèbe G. [и др.]. Insulin induces long-term depression of ventral tegmental area dopamine neurons via endocannabinoids // *Nature Neuroscience*. 2013. № 3 (16). С. 300–308.
452. LaFerla F. M., Green K. N. Animal Models of Alzheimer Disease // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 11 (2). С. a006320–a006320.
453. LaFerla F. M., Oddo S. Alzheimer's disease: $A\beta$, tau and synaptic dysfunction // *Trends in Molecular Medicine*. 2005. № 4 (11). С. 170–176.
454. Lahmy V. [и др.]. Blockade of Tau Hyperphosphorylation and $A\beta$ 1–42 Generation by the Aminotetrahydrofuran Derivative ANAVEX2-73, a Mixed Muscarinic and σ 1 Receptor Agonist, in a Nontransgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Neuropsychopharmacology*. 2013. № 9 (38). С. 1706–1723.
455. Lalonde R. [и др.]. Transgenic mice expressing the β APP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination // *Brain Research*. 2003. № 1 (977). С. 38–45.
456. Lalonde R., Kim H. D., Fukuchi K. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP^{swe} + PS1/ Δ E9 mice // *Neuroscience Letters*. 2004. № 2 (369). С. 156–161.
457. Lanna A. [и др.]. A sestrin-dependent Erk–Jnk–p38 MAPK activation complex inhibits immunity during aging // *Nature Immunology*. 2017. № 3 (18). С. 354–363.
458. Lassalle J. M. [и др.]. Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice // *Behavioural Brain Research*. 2008. № 1 (191). С. 104–110.

459. Last D. [и др.]. Global and Regional Effects of Type 2 Diabetes on Brain Tissue Volumes and Cerebral Vasoreactivity // *Diabetes Care*. 2007. № 5 (30). С. 1193–1199.

460. Lazarevic V. [и др.]. Physiological Concentrations of Amyloid Beta Regulate Recycling of Synaptic Vesicles via Alpha7 Acetylcholine Receptor and CDK5/Calcineurin Signaling // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017. (10). С. 221.

461. Leavens K. F., Birnbaum M. J. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2011. № 3 (46). С. 200–215.

462. Ledo J. H. [и др.]. Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice // *Molecular Psychiatry*. 2013. № 10 (18). С. 1053–1054.

463. Lee C. Y. D. [и др.]. Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models // *Neuron*. 2018. № 5 (97). С. 1032-1048.e5.

464. Lee C.-C., Huang C.-C., Hsu K.-S. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways // *Neuropharmacology*. 2011. № 4 (61). С. 867–879.

465. Lee S.-H. [и др.]. Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood // *Molecular Metabolism*. 2016. № 8 (5). С. 589–601.

466. Lee Y. [и др.]. Insulin/IGF Signaling-Related Gene Expression in the Brain of a Sporadic Alzheimer's Disease Monkey Model Induced by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013. № 2 (38). С. 251–267.

467. Legros F. [и др.]. Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins // *Molecular Biology of the Cell*. 2002. № 12 (13). С. 4343–4354.

468. Lei G., Xia Y., Johnson K. M. The Role of Akt-GSK-3 β Signaling and Synaptic Strength in Phencyclidine-Induced Neurodegeneration // *Neuropsychopharmacology*. 2008. № 6 (33). С. 1343–1353.

469. Leino R. L. [и др.]. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain // *Journal of Neuroscience Research*. 1997. № 5 (49). С. 617–626.

470. Lemmon M. A., Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases // *Cell*. 2010. № 7 (141). С. 1117–1134.

471. Leser N., Wagner S. The effects of acute social isolation on long-term social recognition memory // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2015. (124). С. 97–103.

472. Leszek J. [и др.]. Type 3 Diabetes Mellitus: A Novel Implication of Alzheimers Disease // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017. № 12 (17). С. 1331–1335.

473. Levy E. [и др.]. Mutation of the Alzheimer's Disease Amyloid Gene in Hereditary Cerebral Hemorrhage, Dutch Type // *Science*. 1990. № 4959 (248). С. 1124–1126.

474. Li M. [и др.]. Amyloid β Interaction with Receptor for Advanced Glycation End Products Up-Regulates Brain Endothelial CCR5 Expression and Promotes T Cells Crossing the Blood-Brain Barrier // *The Journal of Immunology*. 2009. № 9 (182). С. 5778–5788.

475. Li S. [и др.]. Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake // *Neuron*. 2009. № 6 (62). С. 788–801.

476. Li X.-H. [и др.]. AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation // *Neurobiology of Aging*. 2012. № 7 (33). С. 1400–1410.

477. Li X.-Y. [и др.]. Age- and Brain Region-Specific Changes of Glucose Metabolic Disorder, Learning, and Memory Dysfunction in Early Alzheimer's

Disease Assessed in APP/PS1 Transgenic Mice Using 18F-FDG-PET // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. № 10 (17). С. 1707.

478. Lin M. T., Beal M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Nature*. 2006. № 7113 (443). С. 787–795.

479. Lindqvist A. [и др.]. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats // *European Journal of Neurology*. 2006. № 12 (13). С. 1385–1388.

480. Ling X. [и др.]. Amyloid beta antagonizes insulin promoted secretion of the amyloid beta protein precursor // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2002. № 5 (4). С. 369–374.

481. Liu J. [и др.]. Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice // *Nature Neuroscience*. 2012. № 12 (15). С. 1621–1623.

482. Liu S. [и др.]. Consumption of palatable food primes food approach behavior by rapidly increasing synaptic density in the VTA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. № 9 (113). С. 2520–2525.

483. Liu X. [и др.]. Dual Mechanisms for Glucose 6-Phosphate Inhibition of Human Brain Hexokinase // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 44 (274). С. 31155–31159.

484. Liu X. [и др.]. Effect of pioglitazone on insulin resistance in fructose-drinking rats correlates with AGEs/RAGE inhibition and block of NADPH oxidase and NF kappa B activation // *European Journal of Pharmacology*. 2010. № 1–3 (629). С. 153–158.

485. Liu Y. [и др.]. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease // *FEBS Letters*. 2008. № 2 (582). С. 359–364.

486. Liu Y. [и др.]. Brain glucose transporters, *O*-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease // *Journal of Neurochemistry*. 2009. № 1 (111). С. 242–249.

487. Liu Y. [и др.]. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes // *The Journal of Pathology*. 2011. № 1 (225). С. 54–62.

488. Liu Y. [и др.]. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells // *Microvascular Research*. 2013. (90). С. 199–205.
489. Liu Y. [и др.]. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis // *Molecular Cancer*. 2018. № 1 (17). С. 104.
490. Livingstone C., Lyall H., Gould G. W. Hypothalamic GLUT 4 expression: a glucose- and insulin-sensing mechanism? // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1995. № 1 (107). С. 67–70.
491. Logan S. [и др.]. Insulin-like growth factor receptor signaling regulates working memory, mitochondrial metabolism, and amyloid- β uptake in astrocytes // *Molecular Metabolism*. 2018. (9). С. 141–155.
492. Lourenco M. V. [и др.]. TNF- α Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's β -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys // *Cell Metabolism*. 2013. № 6 (18). С. 831–843.
493. Lu T. [и др.]. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain // *Nature*. 2004. № 6994 (429). С. 883–891.
494. Lucke-Wold B. P. [и др.]. Common mechanisms of Alzheimer's disease and ischemic stroke: the role of protein kinase C in the progression of age-related neurodegeneration // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2015. № 3 (43). С. 711–724.
495. Lundgaard I. [и др.]. Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism // *Nature Communications*. 2015. (6). С. 6807.
496. Luo F. [и др.]. Characterization of 7- and 19-month-old Tg2576 mice using multimodal in vivo imaging: limitations as a translatable model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of Aging*. 2012. № 5 (33). С. 933–944.
497. Ly P. T. T. [и др.]. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes // *Journal of Clinical Investigation*. 2013. № 1 (123). С. 224–235.

498. Lyra e Silva N. de M. [и др.]. Understanding the link between insulin resistance and Alzheimer's disease: Insights from animal models // *Experimental Neurology*. 2019. (316). С. 1–11.

499. M. de la Monte S. Brain Insulin Resistance and Deficiency as Therapeutic Targets in Alzheimers Disease // *Current Alzheimer Research*. 2012. № 1 (9). С. 35–66.

500. Ma J. [и др.]. Peripheral Blood Adipokines and Insulin Levels in Patients with Alzheimer's Disease: A Replication Study and Meta-Analysis // *Current Alzheimer Research*. 2016. № 3 (13). С. 223–233.

501. Ma Q.-L. [и др.]. -Amyloid Oligomers Induce Phosphorylation of Tau and Inactivation of Insulin Receptor Substrate via c-Jun N-Terminal Kinase Signaling: Suppression by Omega-3 Fatty Acids and Curcumin // *Journal of Neuroscience*. 2009. № 28 (29). С. 9078–9089.

502. Macauley S. L. [и др.]. Hyperglycemia modulates extracellular amyloid- β concentrations and neuronal activity in vivo // *The Journal of Clinical Investigation*. 2015. № 6 (125). С. 2463–2467.

503. Macháčková K. [и др.]. Converting Insulin-like Growth Factors 1 and 2 into High-Affinity Ligands for Insulin Receptor Isoform A by the Introduction of an Evolutionarily Divergent Mutation // *Biochemistry*. 2018. № 16 (57). С. 2373–2382.

504. Mackic J. B. [и др.]. Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1-40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. // *Journal of Clinical Investigation*. 1998. № 4 (102). С. 734–743.

505. MacKnight C. [и др.]. Diabetes mellitus and the risk of dementia, Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment in the Canadian Study of Health and Aging // *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2002. № 2 (14). С. 77–83.

506. Madabhushi R., Pan L., Tsai L.-H. DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration // *Neuron*. 2014. № 2 (83). С. 266–282.

507. Magaki S. [и др.]. The effects of cerebral amyloid angiopathy on integrity of the blood-brain barrier // *Neurobiology of Aging*. 2018. (70). С. 70–77.
508. Magistretti P. J., Allaman I. *Brain Energy Metabolism* под ред. D. W. Pfaff, New York, NY: Springer New York, 2013. С. 1591–1620.
509. Magistretti P. J., Allaman I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging // *Neuron*. 2015. № 4 (86). С. 883–901.
510. Magistretti P. J., Pellerin L. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain // *Physiology*. 1999. № 5 (14). С. 177–182.
511. Mainardi M., Fusco S., Grassi C. Modulation of Hippocampal Neural Plasticity by Glucose-Related Signaling // *Neural Plasticity*. 2015. (2015). С. 1–10.
512. Mamelak M. Sporadic Alzheimer's Disease: The Starving Brain // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. № 3 (31). С. 459–474.
513. Man H.-Y. [и др.]. Regulation of AMPA Receptor–Mediated Synaptic Transmission by Clathrin-Dependent Receptor Internalization // *Neuron*. 2000. № 3 (25). С. 649–662.
514. Manaenko A. [и др.]. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model // *Journal of Neuroscience Methods*. 2011. № 2 (195). С. 206–210.
515. Manczak M. [и др.]. Differential Expression of Oxidative Phosphorylation Genes in Patients With Alzheimer's Disease: Implications for Early Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage // *NeuroMolecular Medicine*. 2004. № 2 (5). С. 147–162.
516. Mao Y. [и др.]. Intranasal insulin alleviates cognitive deficits and amyloid pathology in young adult APP swe/ PS 1dE9 mice // *Aging Cell*. 2016. № 5 (15). С. 893–902.
517. Maqbool M., Hoda N. GSK3 Inhibitors in the Therapeutic Development of Diabetes, Cancer and Neurodegeneration: Past, Present and Future // *Current Pharmaceutical Design*. 2017. № 29 (23). С. 4332–4350.

518. Marciniak E. [и др.]. Tau deletion promotes brain insulin resistance // *Journal of Experimental Medicine*. 2017. № 8 (214). С. 2257–2269.

519. Marco S., Skaper S. D. Amyloid β -peptide_{1–42} alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells // *Neuroscience Letters*. 2006. № 3 (401). С. 219–224.

520. Marks J. L. [и др.]. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization // *Endocrinology*. 1990. № 6 (127). С. 3234–3236.

521. Marques C. A. [и др.]. Neurotoxic Mechanisms Caused by the Alzheimer's Disease-linked Swedish Amyloid Precursor Protein Mutation // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. № 30 (278). С. 28294–28302.

522. Marques F. [и др.]. Blood–brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease // *Molecular Neurodegeneration*. 2013. № 1 (8). С. 38.

523. Martín E. D. [и др.]. IRS-2 Deficiency Impairs NMDA Receptor-Dependent Long-term Potentiation // *Cerebral Cortex*. 2012. № 8 (22). С. 1717–1727.

524. Martin L. [и др.]. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease // *Ageing Research Reviews*. 2013. № 1 (12). С. 289–309.

525. Martin L., Iceberg E. Quantifying Social Motivation in Mice Using Operant Conditioning // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2015. № 102. С. e53009.

526. Matos M. [и др.]. Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: Involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades // *Neuroscience*. 2008. № 4 (156). С. 898–910.

527. Mattson M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease // *Nature*. 2004. № 7000 (430). С. 631–639.

528. Mattson M. P., Gleichmann M., Cheng A. Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders // *Neuron*. 2008. № 5 (60). С. 748–766.

529. Mazucanti C. H. [и др.]. Release of insulin produced by the choroid plexis is regulated by serotonergic signaling // *JCI Insight*. 2019. № 23 (4). С. e131682.

530. McNay E. C. [и др.]. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2010. № 4 (93). С. 546–553.

531. McNay E. C., Fries T. M., Gold P. E. Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. № 6 (97). С. 2881–2885.

532. Meier-Ruge W. [и др.]. Neurochemical findings in the aging brain // *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. 1980. (23). С. 323–338.

533. Meijer R. I. [и др.]. Pathways for insulin access to the brain: the role of the microvascular endothelial cell // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2016. № 5 (311). С. H1132–H1138.

534. Mergenthaler P. [и др.]. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function // *Trends in Neurosciences*. 2013. № 10 (36). С. 587–597.

535. Miao J. [и др.]. Cerebral microvascular amyloid beta protein deposition induces vascular degeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing human vasculotropic mutant amyloid beta precursor protein // *The American Journal of Pathology*. 2005. № 2 (167). С. 505–515.

536. Mielke J. G. [и др.]. A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance: Diet-induced brain insulin resistance // *Journal of Neurochemistry*. 2005. № 6 (93). С. 1568–1578.

537. Migliore L. [и др.]. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients // *Neurobiology of Aging*. 2005. № 5 (26). С. 567–573.

538. Milad M. R., Quirk G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress // *Annual Review of Psychology*. 2012. (63). С. 129–151.

539. Miller M. C. [и др.]. Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease // *Brain Research*. 2008. (1230). С. 273–280.

540. Miñano-Molina A. J. [и др.]. Soluble Oligomers of Amyloid- β Peptide Disrupt Membrane Trafficking of α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic Acid Receptor Contributing to Early Synapse Dysfunction* // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. № 31 (286). С. 27311–27321.

541. Minogue A. M. [и др.]. Activation of the c-Jun N-terminal Kinase Signaling Cascade Mediates the Effect of Amyloid- β on Long Term Potentiation and Cell Death in Hippocampus // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. № 30 (278). С. 27971–27980.

542. Minopoli G. [и др.]. Fe65 matters: New light on an old molecule // *IUBMB Life*. 2012. № 12 (64). С. 936–942.

543. Moechars D. [и др.]. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice // *The EMBO journal*. 1996. № 6 (15). С. 1265–1274.

544. Moechars D. [и др.]. Early Phenotypic Changes in Transgenic Mice That Overexpress Different Mutants of Amyloid Precursor Protein in Brain // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 10 (274). С. 6483–6492.

545. Moghbelinejad S. [и др.]. Rutin activates the MAPK pathway and BDNF gene expression on beta-amyloid induced neurotoxicity in rats // *Toxicology Letters*. 2014. № 1 (224). С. 108–113.

546. Molina J. A. [и др.]. Cerebrospinal fluid levels of insulin in patients with Alzheimer's disease: **Insulin and Alzheimer's disease** // *Acta Neurologica Scandinavica*. 2002. № 6 (106). С. 347–350.

547. Molofsky A. V. [и др.]. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective // *Genes & Development*. 2012. № 9 (26). С. 891–907.

548. Moloney A. M. [и др.]. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling // *Neurobiology of Aging*. 2010. № 2 (31). С. 224–243.

549. Montagne A. [и др.]. Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease // *Acta Neuropathologica*. 2016. № 5 (131). С. 687–707.

550. Monte S. M. de la Triangulated mal-signaling in Alzheimer's disease: roles of neurotoxic ceramides, ER stress, and insulin resistance reviewed // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2012. (30 Suppl 2). C. S231-249.

551. Monte S. M. de la Insulin Resistance and Neurodegeneration: Progress Towards the Development of New Therapeutics for Alzheimer's Disease // *Drugs*. 2017. № 1 (77). C. 47–65.

552. Monte S. M. de la [и др.]. Early-Stage Alzheimer's Disease Is Associated with Simultaneous Systemic and Central Nervous System Dysregulation of Insulin-Linked Metabolic Pathways // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019. № 2 (68). C. 657–668.

553. Moran C. [и др.]. Brain Atrophy in Type 2 Diabetes: Regional distribution and influence on cognition // *Diabetes Care*. 2013. № 12 (36). C. 4036–4042.

554. Moreno-Gonzalez I. [и др.]. Molecular interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease through cross-seeding of protein misfolding // *Molecular Psychiatry*. 2017. № 9 (22). C. 1327–1334.

555. Mosconi L., Pupi A., De Leon M. J. Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. № 1 (1147). C. 180–195.

556. Mosienko V., Teschemacher A. G., Kasparov S. Is L-Lactate a Novel Signaling Molecule in the Brain? // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015. № 7 (35). C. 1069–1075.

557. Mucke L. [и др.]. High-Level Neuronal Expression of A β _{1–42} in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation // *The Journal of Neuroscience*. 2000. № 11 (20). C. 4050–4058.

558. Mucke L., Selkoe D. J. Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 7 (2). C. a006338–a006338.

559. Mullins R. J. [и др.]. Exosomal biomarkers of brain insulin resistance associated with regional atrophy in Alzheimer's disease: Brain IR and AD Atrophy // *Human Brain Mapping*. 2017. № 4 (38). С. 1933–1940.

560. Münch G. [и др.]. Alzheimer's disease – synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts // *Journal of Neural Transmission*. 1998. № 4 (105). С. 439.

561. Muneer P. M. A. [и др.]. Inhibitory effects of alcohol on glucose transport across the blood–brain barrier leads to neurodegeneration: preventive role of acetyl-l-carnitine // *Psychopharmacology*. 2011. № 3 (214). С. 707–718.

562. Muniyappa R., Yavuz S. Metabolic actions of angiotensin II and insulin: A microvascular endothelial balancing act // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013. № 1–2 (378). С. 59–69.

563. Muraleva N. A., Kolosova N. G., Stefanova N. A. p38 MAPK–dependent alphaB-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease–like pathology in OXYS rats // *Experimental Gerontology*. 2019. (119). С. 45–52.

564. Muraleva N. A., Kolosova N. G., Stefanova N. A. MEK1/2-ERK Pathway Alterations as a Therapeutic Target in Sporadic Alzheimer's Disease: A Study in Senescence-Accelerated OXYS Rats // *Antioxidants*. 2021. № 7 (10). С. 1058.

565. Musiek E. S., Holtzman D. M. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and «wingmen» // *Nature Neuroscience*. 2015. № 6 (18). С. 800–806.

566. Myung N.-H. [и др.]. Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes // *AGE*. 2008. № 4 (30). С. 209–215.

567. Nadler J. J. [и др.]. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice // *Genes, Brain and Behavior*. 2004. № 5 (3). С. 303–314.

568. Nagy H. [и др.]. The effects of reward and punishment contingencies on decision-making in multiple sclerosis // *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2006. № 04 (12).

569. Nakabeppu Y. Origins of Brain Insulin and Its Function Advances in Experimental Medicine and Biology / под ред. Y. Nakabeppu, T. Ninomiya, Singapore: Springer Singapore, 2019. С. 1–11.

570. Nasoohi S., Parveen K., Ishrat T. Metabolic Syndrome, Brain Insulin Resistance, and Alzheimer's Disease: Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) and Inflammasome as Core Amplifiers // Journal of Alzheimer's Disease. 2018. № 3 (66). С. 857–885.

571. Nation D. A. [и др.]. Blood–brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction // Nature Medicine. 2019. № 2 (25). С. 270–276.

572. Nawaratne R. [и др.]. Regulation of insulin receptor substrate 1 pleckstrin homology domain by protein kinase C: role of serine 24 phosphorylation // Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.). 2006. № 8 (20). С. 1838–1852.

573. Nelson T. J. [и др.]. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair // European Journal of Pharmacology. 2008. № 1 (585). С. 76–87.

574. Nemoto T. [и др.]. New insights concerning insulin synthesis and its secretion in rat hippocampus and cerebral cortex: Amyloid- β 1–42-induced reduction of proinsulin level via glycogen synthase kinase-3 β // Cellular Signalling. 2014. № 2 (26). С. 253–259.

575. Neth B. J., Craft S. Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages // Frontiers in Aging Neuroscience. 2017. (9). С. 345.

576. Newman L. A., Korol D. L., Gold P. E. Lactate Produced by Glycogenolysis in Astrocytes Regulates Memory Processing // PLoS ONE. 2011. № 12 (6). С. e28427.

577. Nichols E. [и др.]. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // The Lancet Neurology. 2019. № 1 (18). С. 88–106.

578. Nisticò R. [и др.]. Insulin receptor β -subunit haploinsufficiency impairs hippocampal late-phase LTP and recognition memory // *Neuromolecular Medicine*. 2012. № 4 (14). С. 262–269.

579. Noble W. [и др.]. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. № 19 (102). С. 6990–6995.

580. Oakley H. [и др.]. Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation // *Journal of Neuroscience*. 2006. № 40 (26). С. 10129–10140.

581. Oddo S. [и др.]. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles // *Neuron*. 2003. № 3 (39). С. 409–421.

582. Ognibene E. [и др.]. Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease // *Behavioural Brain Research*. 2005. № 2 (156). С. 225–232.

583. O'Grady J. P. [и др.]. Elevated Insulin and Insulin Resistance are Associated with Altered Myelin in Cognitively Unimpaired Middle-Aged Adults // *Obesity*. 2019. С. oby.22558.

584. O'Hare E. [и др.]. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated $A\beta(1-42)$ // *Brain Research*. 1999. № 1 (815). С. 1–10.

585. Ohm T. G. The dentate gyrus in Alzheimer's disease Elsevier, 2007. С. 723–740.

586. Ohno M. [и др.]. Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1 // *European Journal of Neuroscience*. 2006. № 1 (23). С. 251–260.

587. Okouchi M. [и др.]. NRF2-dependent glutamate-L-cysteine ligase catalytic subunit expression mediates insulin protection against hyperglycemia-induced brain endothelial cell apoptosis // *Current Neurovascular Research*. 2006. № 4 (3). С. 249–261.

588. O'Leary T. P. [и др.]. Motor function deficits in the 12 month-old female 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease // Behavioural Brain Research. 2018. (337). С. 256–263.

589. on behalf of the Parelsnoer Institute Neurodegenerative Diseases study group [и др.]. Association of Cerebrospinal Fluid (CSF) Insulin with Cognitive Performance and CSF Biomarkers of Alzheimer's Disease // Journal of Alzheimer's Disease. 2017. № 1 (61). С. 309–320.

590. Otvos L. [и др.]. Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents // European Journal of Biochemistry. 1993. № 1–2 (211). С. 249–257.

591. Oules B. [и др.]. Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid- Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease // Journal of Neuroscience. 2012. № 34 (32). С. 11820–11834.

592. Pai M.-C., Jacobs W. J. Topographical disorientation in community-residing patients with Alzheimer's disease // International Journal of Geriatric Psychiatry. 2004. № 3 (19). С. 250–255.

593. Palop J. J. [и др.]. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. № 16 (100). С. 9572–9577.

594. Pandini G. [и др.]. Insulin Has Multiple Anti-amyloidogenic Effects on Human Neuronal Cells // Endocrinology. 2013. № 1 (154). С. 375–387.

595. Pardeshi R. [и др.]. Insulin signaling: An opportunistic target to minimize the risk of Alzheimer's disease // Psychoneuroendocrinology. 2017. (83). С. 159–171.

596. Paris D. [и др.]. Impaired angiogenesis in a transgenic mouse model of cerebral amyloidosis // Neuroscience Letters. 2004. № 1 (366). С. 80–85.

597. Park C. [и др.]. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task // Physiology & Behavior. 2000. № 4 (68). С. 509–514.

598. Park S. A., Han S. M., Kim C. E. New fluid biomarkers tracking non-amyloid- β and non-tau pathology in Alzheimer's disease // *Experimental & Molecular Medicine*. 2020. № 4 (52). C. 556–568.
599. Paula-Lima A. C., Brito-Moreira J., Ferreira S. T. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease // *Journal of Neurochemistry*. 2013. № 2 (126). C. 191–202.
600. Pearce J. M., Roberts A. D. L., Good M. Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors // *Nature*. 1998. № 6706 (396). C. 75–77.
601. Pearson G. [и др.]. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions* // *Endocrine Reviews*. 2001. № 2 (22). C. 153–183.
602. Pearson-Leary J., McNay E. C. Intrahippocampal Administration of Amyloid- β 1-42 Oligomers Acutely Impairs Spatial Working Memory, Insulin Signaling, and Hippocampal Metabolism // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012. № 2 (30). C. 413–422.
603. Peca S. [и др.]. Neurovascular decoupling is associated with severity of cerebral amyloid angiopathy // *Neurology*. 2013. № 19 (81). C. 1659–1665.
604. Pederson T. M., Kramer D. L., Rondinone C. M. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation // *Diabetes*. 2001. № 1 (50). C. 24–31.
605. Peleh T. [и др.]. The reverse translation of a quantitative neuropsychiatric framework into preclinical studies: Focus on social interaction and behavior // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019. (97). C. 96–111.
606. Penley S. C., Gaudet C. M., Threlkeld S. W. Use of an eight-arm radial water maze to assess working and reference memory following neonatal brain injury // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2013. № 82. C. 50940.
607. Perl A. [и др.]. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity // *Trends in Immunology*. 2004. № 7 (25). C. 360–367.

608. Picone P. [и др.]. Insulin-activated Akt rescues A β oxidative stress-induced cell death by orchestrating molecular trafficking: Insulin signalling antagonizes A β toxicity // *Aging Cell*. 2011. № 5 (10). С. 832–843.
609. Piermartiri T. C. B. [и др.]. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1–40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage // *Experimental Neurology*. 2010. № 2 (226). С. 274–284.
610. Piroli G. G. [и др.]. Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus // *Neuroendocrinology*. 2007. № 2 (85). С. 71–80.
611. Poduslo J. F. [и др.]. Permeability of Proteins at the Blood–Brain Barrier in the Normal Adult Mouse and Double Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease // *Neurobiology of Disease*. 2001. № 4 (8). С. 555–567.
612. Poisnel G. [и др.]. Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer’s disease // *Neurobiology of Aging*. 2012. № 9 (33). С. 1995–2005.
613. Polidori M., Nelles G. Antioxidant Clinical Trials in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer’s disease – Challenges and Perspectives // *Current Pharmaceutical Design*. 2014. № 18 (20). С. 3083–3092.
614. Pomytkin I. [и др.]. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2018. № 9 (24). С. 763–774.
615. Poon C. H. [и др.]. Rodent Models of Amyloid-Beta Feature of Alzheimer’s Disease: Development and Potential Treatment Implications // *Aging and disease*. 2020. № 5 (11). С. 1235.
616. Porcellotti S. [и др.]. Oxidative Stress during the Progression of β -Amyloid Pathology in the Neocortex of the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer’s Disease // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015. (2015). С. 1–18.
617. Powell N. D. [и др.]. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via -adrenergic induction of myelopoiesis //

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. № 41 (110). С. 16574–16579.

618. Prasad K. AGE–RAGE stress: a changing landscape in pathology and treatment of Alzheimer’s disease // *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2019. № 1–2 (459). С. 95–112.

619. Praticò D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer’s disease: a reappraisal // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008. № 12 (29). С. 609–615.

620. Prediger R. [и др.]. Differential susceptibility following β -amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response // *Behavioural Brain Research*. 2007. № 2 (177). С. 205–213.

621. Presta I. [и др.]. Angiotensin II type 1 receptor, but no type 2 receptor, interferes with the insulin-induced nitric oxide production in HUVECs // *Atherosclerosis*. 2011. № 2 (219). С. 463–467.

622. Prince M. [и др.]. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis // *Alzheimer’s & Dementia*. 2013. № 1 (9). С. 63-75.e2.

623. Prince, Martin James [и др.]. World Alzheimer Report 2016 - Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future / Prince, Martin James, Comas-Herrera, Adelina, Knapp, Martin, Guerchet, Maelenn Mari, Karagiannidou, Maria, London: Alzheimer’s Disease International, 2016. 131 с.

624. Puertas M. del C. [и др.]. Plasma renin–angiotensin system-regulating aminopeptidase activities are modified in early stage Alzheimer’s disease and show gender differences but are not related to apolipoprotein E genotype // *Experimental Gerontology*. 2013. № 6 (48). С. 557–564.

625. Pugazhenti S. *Metabolic Syndrome and the Cellular Phase of Alzheimer’s Disease* Elsevier, 2017. С. 243–258.

626. Puzzo D. [и др.]. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer’s disease: practical considerations and guidelines // *Biochemical Pharmacology*. 2014. № 4 (88). С. 450–467.

627. Puzzo D. [и др.]. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery // *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2015. № 7 (10). С. 703–711.
628. Puzzo D., Privitera L., Palmeri A. Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory // *Neurobiology of Aging*. 2012. № 7 (33). С. 1484.e15-1484.e24.
629. Qiu W., Folstein M. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- β peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis // *Neurobiology of Aging*. 2006. № 2 (27). С. 190–198.
630. Qu Z.-S. [и др.]. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Production of Amyloid- β Peptides and Tau Phosphorylation in Diabetic Rat Brain // *The Scientific World Journal*. 2014. (2014). С. 1–8.
631. Rabiee N., Bagherzadeh M., Rabiee M. A Perspective to the Correlation Between Brain Insulin Resistance and Alzheimer: Medicinal Chemistry Approach // *Current Diabetes Reviews*. 2019. № 4 (15). С. 255–258.
632. Racaniello M. [и др.]. Phosphorylation Changes of CaMKII, ERK1/2, PKB/Akt Kinases and CREB Activation During Early Long-Term Potentiation at Schaffer Collateral-CA1 Mouse Hippocampal Synapses // *Neurochemical Research*. 2010. № 2 (35). С. 239–246.
633. Rankin C. A., Sun Q., Gamblin T. C. Tau phosphorylation by GSK-3 β promotes tangle-like filament morphology // *Molecular Neurodegeneration*. 2007. № 1 (2). С. 12.
634. Razay G., Wilcock G. K. Hyperinsulinaemia and Alzheimer's Disease // *Age and Ageing*. 1994. № 5 (23). С. 396–399.
635. Reagan L. P. [и др.]. Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. № 5 (98). С. 2820–2825.
636. Recio-Pinto E., Rechler M. M., Ishii D. N. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1986. № 5 (6). С. 1211–1219.

637. Reddy P. H. [и др.]. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease // *Human Molecular Genetics*. 2004. № 12 (13). С. 1225–1240.

638. Redjems-Bennani N. [и др.]. Abnormal Substrate Levels That Depend upon Mitochondrial Function in Cerebrospinal Fluid from Alzheimer Patients // *Gerontology*. 1998. № 5 (44). С. 300–304.

639. Reger M. A. [и др.]. Intranasal Insulin Administration Dose-Dependently Modulates Verbal Memory and Plasma Amyloid- β in Memory-Impaired Older Adults // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008. № 3 (13). С. 323–331.

640. Reijerkerk A. [и др.]. MicroRNAs Regulate Human Brain Endothelial Cell-Barrier Function in Inflammation: Implications for Multiple Sclerosis // *Journal of Neuroscience*. 2013. № 16 (33). С. 6857–6863.

641. Reiman E. M. [и др.]. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 1 (101). С. 284–289.

642. Ren B. [и др.]. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats // *European Journal of Pharmacology*. 2016. (773). С. 13–23.

643. Rensink A. A. M. [и др.]. Insulin inhibits amyloid β -induced cell death in cultured human brain pericytes // *Neurobiology of Aging*. 2004. № 1 (25). С. 93–103.

644. Rhea E. M. [и др.]. Insulin BBB pharmacokinetics in young apoE male and female transgenic mice // *PLOS ONE*. 2020. № 1 (15). С. e0228455.

645. Rhea E. M., Rask-Madsen C., Banks W. A. Insulin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the insulin receptor: Insulin transport across the BBB // *The Journal of Physiology*. 2018. № 19 (596). С. 4753–4765.

646. Rhea E. M., Salameh T. S., Banks W. A. Routes for the delivery of insulin to the central nervous system: A comparative review // *Experimental Neurology*. 2019. (313). С. 10–15.

647. Richter S. H. [и др.]. Where have I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression // *PloS One*. 2013. № 4 (8). С. e62458.

648. Rickle A. [и др.]. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: // *NeuroReport*. 2004. № 6 (15). С. 955–959.

649. Riske L. [и др.]. Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder // *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. 2017. № 2 (7). С. 85–89.

650. Rivera E. J. [и др.]. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine // *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2005. № 3 (8). С. 247–268.

651. Rockenstein E. [и др.]. Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2007. № 8 (27). С. 1981–1991.

652. Rodrigues M. A. [и др.]. The Edinburgh CT and genetic diagnostic criteria for lobar intracerebral haemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy: model development and diagnostic test accuracy study // *The Lancet Neurology*. 2018. № 3 (17). С. 232–240.

653. Rojas S. [и др.]. In vivo evaluation of amyloid deposition and brain glucose metabolism of 5XFAD mice using positron emission tomography // *Neurobiology of Aging*. 2013. № 7 (34). С. 1790–1798.

654. Rom S. [и др.]. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models // *Molecular Neurobiology*. 2019. № 3 (56). С. 1883–1896.

655. Rombouts S. A. R. B. [и др.]. Delayed rather than decreased BOLD response as a marker for early Alzheimer's disease // *NeuroImage*. 2005. № 4 (26). С. 1078–1085.

656. Rosenzweig S. A. The Continuing Evolution of Insulin-like Growth Factor Signaling // *F1000Research*. 2020. (9). C. 205.

657. Rosi S. [и др.]. Chemokine receptor 5 antagonist D-Ala-peptide T-amide reduces microglia and astrocyte activation within the hippocampus in a neuroinflammatory rat model of Alzheimer's disease // *Neuroscience*. 2005. № 2 (134). C. 671–676.

658. Rudy J. W., O'Reilly R. C. Conjunctive representations, the hippocampus, and contextual fear conditioning // *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*. 2001. № 1 (1). C. 66–82.

659. Rulifson E. J. Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes // *Science*. 2002. № 5570 (296). C. 1118–1120.

660. Rusina R. [и др.]. Higher Aluminum Concentration in Alzheimer's Disease After Box–Cox Data Transformation // *Neurotoxicity Research*. 2011. № 4 (20). C. 329–333.

661. Rusinek H. [и др.]. Cerebral Perfusion in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015. № 1 (35). C. 95–102.

662. Rustad J. K. [и др.]. Decision-Making in Diabetes Mellitus Type 1 // *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 2013. № 1 (25). C. 40–50.

663. Sabo S. L. [и др.]. Regulation of β -Amyloid Secretion by FE65, an Amyloid Protein Precursor-binding Protein // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 12 (274). C. 7952–7957.

664. Saeedi P. [и др.]. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition // *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2019. (157). C. 107843.

665. Sagare A. P., Bell R. D., Zlokovic B. V. Neurovascular Dysfunction and Faulty Amyloid -Peptide Clearance in Alzheimer Disease // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. № 10 (2). C. a011452–a011452.

666. Saito T. [и др.]. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43 // *Nature Neuroscience*. 2011. № 8 (14). С. 1023–1032.

667. Sakamuru S., Attene-Ramos M. S., Xia M. *Mitochondrial Membrane Potential Assay Methods in Molecular Biology* / под ред. H. Zhu, M. Xia, New York, NY: Springer New York, 2016. С. 17–22.

668. Salameh T. S. [и др.]. Central Nervous System Delivery of Intranasal Insulin: Mechanisms of Uptake and Effects on Cognition // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. № 3 (47). С. 715–728.

669. Salameh T. S. [и др.]. Blood–Brain Barrier Disruption and Neurovascular Unit Dysfunction in Diabetic Mice: Protection with the Mitochondrial Carbonic Anhydrase Inhibitor Topiramate // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016. № 3 (359). С. 452–459.

670. Salcedo I. [и др.]. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders: Neurological benefits of GLP-1 receptor activation // *British Journal of Pharmacology*. 2012. № 5 (166). С. 1586–1599.

671. Salcedo-Tello P., Ortiz-Matamoros A., Arias C. GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration // *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. (2011). С. 1–12.

672. Saltiel A. R., Kahn C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism // *Nature*. 2001. № 6865 (414). С. 799–806.

673. Sancheti H. [и др.]. Reversal of Metabolic Deficits by Lipoic Acid in a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease: A ¹³ C NMR Study // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014. № 2 (34). С. 288–296.

674. Sanderson T. M. [и др.]. Hippocampal metabotropic glutamate receptor long-term depression in health and disease: focus on mitogen-activated protein kinase pathways // *Journal of Neurochemistry*. 2016. (139). С. 200–214.

675. Sankowski R., Mader S., Vald s-Ferrer S. I. Systemic Inflammation and the Brain: Novel Roles of Genetic, Molecular, and Environmental Cues as Drivers of Neurodegeneration // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015. (9).

676. Santiard-Baron D. [и др.]. Expression of human FE65 in amyloid precursor protein transgenic mice is associated with a reduction in beta-amyloid load // *Journal of Neurochemistry*. 2005. № 2 (93). С. 330–338.

677. Santos D. B. [и др.]. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice // *Experimental Neurology*. 2012. № 2 (233). С. 767–775.

678. Saw G. [и др.]. Epigenetic regulation of microglial phosphatidylinositol 3-kinase pathway involved in long-term potentiation and synaptic plasticity in rats // *Glia*. 2020. № 3 (68). С. 656–669.

679. Schechter R. [и др.]. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system // *Brain Research*. 1996. № 1–2 (736). С. 16–27.

680. Schechter R., Beju D., Miller K. E. The effect of insulin deficiency on tau and neurofilament in the insulin knockout mouse // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. № 4 (334). С. 979–986.

681. Schlageter N. L., Carson R. E., Rapoport S. I. Examination of Blood — Brain Barrier Permeability in Dementia of the Alzheimer Type with [^{68}Ga]EDTA and Positron Emission Tomography // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1987. № 1 (7). С. 1–8.

682. Schliebs R., Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration // *Behavioural Brain Research*. 2011. № 2 (221). С. 555–563.

683. Schubert M. [и др.]. Insulin Receptor Substrate-2 Deficiency Impairs Brain Growth and Promotes Tau Phosphorylation // *The Journal of Neuroscience*. 2003. № 18 (23). С. 7084–7092.

684. Schubert M. [и др.]. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 9 (101). С. 3100–3105.

685. Schulingkamp R. J. [и др.]. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2000. № 8 (24). С. 855–872.

686. Schwartz M. W. [и др.]. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. // *Journal of Clinical Investigation*. 1991. № 4 (88). С. 1272–1281.

687. Schweinzer C. [и др.]. Processing of Endogenous A β PP in Blood-Brain Barrier Endothelial Cells is Modulated by Liver-X Receptor Agonists and Altered Cellular Cholesterol Homeostasis // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. № 2 (27). С. 341–360.

688. Scuderi C. [и др.]. Palmitoylethanolamide controls reactive gliosis and exerts neuroprotective functions in a rat model of Alzheimer's disease // *Cell Death & Disease*. 2014. № 9 (5). С. e1419–e1419.

689. Selkoe D. J. Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs // *Neuron*. 2001. № 2 (32). С. 177–180.

690. Selkoe D. J. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure // *Science*. 2002. № 5594 (298). С. 789–791.

691. Selkoe D. J. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior // *Behavioural Brain Research*. 2008. № 1 (192). С. 106–113.

692. Selkoe D. J., Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years // *EMBO Molecular Medicine*. 2016. № 6 (8). С. 595–608.

693. Selles M. C. [и др.]. Adenovirus-Mediated Transduction of Insulin-Like Growth Factor 1 Protects Hippocampal Neurons from the Toxicity of A β Oligomers and Prevents Memory Loss in an Alzheimer Mouse Model // *Molecular Neurobiology*. 2020. № 3 (57). С. 1473–1483.

694. Sengillo J. D. [и др.]. Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood-Brain Barrier Disruption in Alzheimer's Disease: Pericytes in Alzheimer's Disease // *Brain Pathology*. 2013. № 3 (23). С. 303–310.

695. Serban A. I. [и др.]. RAGE and TGF- β 1 Cross-Talk Regulate Extracellular Matrix Turnover and Cytokine Synthesis in AGEs Exposed Fibroblast Cells // *PloS One*. 2016. № 3 (11). С. e0152376.

696. Shah K., DeSilva S., Abbruscato T. The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. № 12 (13). С. 12629–12655.

697. Shankar G. M. [и др.]. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory // *Nature Medicine*. 2008. № 8 (14). С. 837–842.

698. Shao B., Bayraktutan U. Hyperglycaemia promotes cerebral barrier dysfunction through activation of protein kinase C- β // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2013. № 11 (15). С. 993–999.

699. Sharma S., Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry // *International Journal of Obesity (2005)*. 2013. № 3 (37). С. 382–389.

700. Shen C. [и др.]. Hydrogen Peroxide Promotes A β Production through JNK-dependent Activation of γ -Secretase // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. № 25 (283). С. 17721–17730.

701. Sheng Z.-H. The Interplay of Axonal Energy Homeostasis and Mitochondrial Trafficking and Anchoring // *Trends in Cell Biology*. 2017. № 6 (27). С. 403–416.

702. Shibata M. [и др.]. Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier // *Journal of Clinical Investigation*. 2000. № 12 (106). С. 1489–1499.

703. Shiiki T. Brain Insulin Impairs Amyloid- (1-40) Clearance from the Brain // *Journal of Neuroscience*. 2004. № 43 (24). С. 9632–9637.

704. Shoji H. [и др.]. Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2014. № 85.

705. Siddiqui M. S. [и др.]. γ H2AX is increased in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer's disease patients in the South Australian Neurodegeneration, Nutrition and DNA Damage (SAND) study of aging // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2018. (829–830). С. 6–18.

706. Silva A. R. T. [и др.]. Repair of Oxidative DNA Damage, Cell-Cycle Regulation and Neuronal Death May Influence the Clinical Manifestation of Alzheimer's Disease // PLoS ONE. 2014. № 6 (9). С. e99897.

707. Simioni S. [и др.]. Progressive decline of decision-making performances during multiple sclerosis // Journal of the International Neuropsychological Society. 2009. № 2 (15). С. 291–295.

708. Simpson J. E. [и др.]. Population variation in oxidative stress and astrocyte DNA damage in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain // Neuropathology and Applied Neurobiology. 2010. № 1 (36). С. 25–40.

709. Sinz H. [и др.]. Impact of ambiguity and risk on decision making in mild Alzheimer's disease // Neuropsychologia. 2008. № 7 (46). С. 2043–2055.

710. Sipos E. [и др.]. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease // Neuroscience. 2007. № 1 (147). С. 28–36.

711. Skeberdis V. A. [и др.]. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. № 6 (98). С. 3561–3566.

712. Small G. W. [и др.]. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. № 11 (97). С. 6037–6042.

713. Small S. A., Duff K. Linking A β and Tau in Late-Onset Alzheimer's Disease: A Dual Pathway Hypothesis // Neuron. 2008. № 4 (60). С. 534–542.

714. Sofola O. [и др.]. Inhibition of GSK-3 Ameliorates A β Pathology in an Adult-Onset Drosophila Model of Alzheimer's Disease // PLoS Genetics. 2010. № 9 (6). С. e1001087.

715. Sokol D. K. [и др.]. High Levels of Alzheimer Beta-Amyloid Precursor Protein (APP) in Children With Severely Autistic Behavior and Aggression // Journal of Child Neurology. 2006. № 6 (21). С. 444–449.

716. Sokolova A. [и др.]. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Plays a Dominant Role in the Chronic Inflammation Observed in Alzheimer's Disease // *Brain Pathology*. 2009. № 3 (19). С. 392–398.

717. Song C., Deng P., Que L. Rapid multiplexed detection of beta-amyloid and total-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018. № 6 (14). С. 1845–1852.

718. Song J. Axons Guided by Insulin Receptor in *Drosophila* Visual System // *Science*. 2003. № 5618 (300). С. 502–505.

719. Song T. [и др.]. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer's disease: A meta-analysis of in vivo magnetic resonance spectroscopy studies // *Ageing Research Reviews*. 2021. (72). С. 101503.

720. Soto M. [и др.]. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. № 13 (116). С. 6379–6384.

721. Sotthibundhu A. [и др.]. -Amyloid1-42 Induces Neuronal Death through the p75 Neurotrophin Receptor // *Journal of Neuroscience*. 2008. № 15 (28). С. 3941–3946.

722. Spindler A. A. [и др.]. Nutritional Status of Patients with Alzheimer's Disease // *Journal of the American Dietetic Association*. 1996. № 10 (96). С. 1013–1018.

723. Spinelli M., Fusco S., Grassi C. Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. (13). С. 788.

724. Sripecthwandee J., Chattipakorn N., Chattipakorn S. C. Links Between Obesity-Induced Brain Insulin Resistance, Brain Mitochondrial Dysfunction, and Dementia // *Frontiers in Endocrinology*. 2018. (9). С. 496.

725. Starkov A. A., Fiskum G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state: ROS production by brain mitochondria // *Journal of Neurochemistry*. 2003. № 5 (86). С. 1101–1107.

726. Steele J. W. [и др.]. Early fear memory defects are associated with altered synaptic plasticity and molecular architecture in the TgCRND8 Alzheimer's disease mouse model: Early synaptic pathology in TgCRND8 AD mice // *Journal of Comparative Neurology*. 2014. № 10 (522). С. 2319–2335.

727. Steen E. [и др.]. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2005. № 1 (7). С. 63–80.

728. Stefanova N. [и др.]. Senescence-accelerated OXYS rats: A model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease // *Cell Cycle*. 2014. № 6 (13). С. 898–909.

729. Stefanova N. A. [и др.]. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats // *Oncotarget*. 2015. № 3 (6). С. 1396–1413.

730. Stefanova N. A. [и др.]. Association of cerebrovascular dysfunction with the development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats // *BMC Genomics*. 2018. № S3 (19). С. 75.

731. Stefanova N. A., Kolosova N. G. Evolution of Alzheimer's disease pathogenesis conception // *Gerontology*. 2016. (71). С. 4–10.

732. Steinbusch L., Labouèbe G., Thorens B. Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2015. № 9 (26). С. 455–466.

733. Stephan B. C. M. [и др.]. Secular Trends in Dementia Prevalence and Incidence Worldwide: A Systematic Review // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018. № 2 (66). С. 653–680.

734. Stern S. A., Chen D. Y., Alberini C. M. The effect of insulin and insulin-like growth factors on hippocampus- and amygdala-dependent long-term memory formation // *Learning & Memory*. 2014. № 10 (21). С. 556–563.

735. Stoeckel L. E. [и др.]. Complex mechanisms linking neurocognitive dysfunction to insulin resistance and other metabolic dysfunction // *F1000Research*. 2016. (5). С. 353.
736. Stöhr O. [и др.]. Insulin receptor signaling mediates APP processing and β -amyloid accumulation without altering survival in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // *AGE*. 2013. № 1 (35). С. 83–101.
737. Stover K. R. [и др.]. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease // *Behavioural Brain Research*. 2015. (289). С. 29–38.
738. Stranahan A. M. [и др.]. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons // *Nature Neuroscience*. 2008. № 3 (11). С. 309–317.
739. Stranahan A. M. [и др.]. Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice // *Hippocampus*. 2009. № 10 (19). С. 951–961.
740. Strange B. A. [и др.]. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis // *Nature Reviews Neuroscience*. 2014. № 10 (15). С. 655–669.
741. Strasser U., Fischer G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation // *Journal of Neuroscience Methods*. 1995. № 2 (57). С. 177–186.
742. Strecker P. [и др.]. FE65 and FE65L1 share common synaptic functions and genetically interact with the APP family in neuromuscular junction formation // *Scientific Reports*. 2016. № 1 (6). С. 25652.
743. Sturchler-Pierrat C. [и др.]. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. № 24 (94). С. 13287–13292.
744. Su F. [и др.]. Brain insulin resistance deteriorates cognition by altering the topological features of brain networks // *NeuroImage: Clinical*. 2017. (13). С. 280–287.

745. Suberbielle E. [и др.]. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β // *Nature Neuroscience*. 2013. № 5 (16). С. 613–621.
746. Sugimoto K. [и др.]. Peripheral neuropathy and microangiopathy in rats with insulinoma: association with chronic hyperinsulinemia // *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2003. № 5 (19). С. 392–400.
747. Suh J. [и др.]. FE65 proteins regulate NMDA receptor activation-induced amyloid precursor protein processing // *Journal of Neurochemistry*. 2011. № 2 (119). С. 377–388.
748. Sun X. [и др.]. Distinct relationships of amyloid-beta and tau deposition to cerebral glucose metabolic networks in Alzheimer's disease // *Neuroscience Letters*. 2020. (717). С. 134699.
749. Sun Y. [и др.]. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2015. № 6 (35). С. 600–604.
750. Sutherland C., Leighton I. A., Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling // *Biochemical Journal*. 1993. № 1 (296). С. 15–19.
751. Suzuki A. [и др.]. Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation // *Cell*. 2011. № 5 (144). С. 810–823.
752. Swaminathan S. K. [и др.]. Insulin differentially affects the distribution kinetics of amyloid beta 40 and 42 in plasma and brain // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2018. № 5 (38). С. 904–918.
753. Swant J. [и др.]. Methamphetamine Reduces LTP and Increases Baseline Synaptic Transmission in the CA1 Region of Mouse Hippocampus // *PLoS ONE*. 2010. № 6 (5). С. e11382.
754. Sweeney M. D., Sagare A. P., Zlokovic B. V. Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Neurovascular Dysfunction in Mild Dementia and Alzheimer's Disease // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015. № 7 (35). С. 1055–1068.

755. Sweeney M. D., Sagare A. P., Zlokovic B. V. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders // *Nature Reviews Neurology*. 2018. № 3 (14). С. 133–150.

756. Taguchi A., Wartschow L. M., White M. F. Brain IRS2 Signaling Coordinates Life Span and Nutrient Homeostasis // *Science*. 2007. № 5836 (317). С. 369–372.

757. Takahashi M. [и др.]. Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain // *Journal of Neurochemistry*. 1994. № 1 (63). С. 245–255.

758. Takano K. [и др.]. Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid β // *Neurochemistry International*. 2018. (119). С. 171–177.

759. Takao K., Miyakawa T. Light/dark transition test for mice // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2006. № 1. С. 104.

760. Takeda S. [и др.]. Increased blood–brain barrier vulnerability to systemic inflammation in an Alzheimer disease mouse model // *Neurobiology of Aging*. 2013. № 8 (34). С. 2064–2070.

761. Takuma K. [и др.]. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid- and neuronal dysfunction // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. № 47 (106). С. 20021–20026.

762. Talbot K. [и др.]. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline // *Journal of Clinical Investigation*. 2012. № 4 (122). С. 1316–1338.

763. Tanaka M. [и др.]. Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures // *Neuroscience Letters*. 1995. № 1 (199). С. 37–40.

764. Tani H. [и др.]. A Local Glutamate-Glutamine Cycle Sustains Synaptic Excitatory Transmitter Release // *Neuron*. 2014. № 4 (81). С. 888–900.

765. Taniguchi C. M., Emanuelli B., Kahn C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2006. № 2 (7). С. 85–96.

766. Tarczyluk M. A. [и др.]. Amyloid β 1-42 Induces Hypometabolism in Human Stem Cell-Derived Neuron and Astrocyte Networks // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015. № 8 (35). С. 1348–1357.

767. Tasharrofi B., Ghafouri-Fard S. Long Non-coding RNAs as Regulators of the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Cancer // *Klinicka Onkologie*. 2018. № 2 (31).

768. Terry R. D. [и др.]. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment // *Annals of Neurology*. 1991. № 4 (30). С. 572–580.

769. Thomas E. [и др.]. Single unit activity in the lateral septum and central nucleus of the amygdala in the elevated plus-maze: A model of exposure therapy? // *Neuroscience Letters*. 2013. (548). С. 269–274.

770. Tiedemann L. J. [и др.]. Central insulin modulates food valuation via mesolimbic pathways // *Nature Communications*. 2017. № 1 (8). С. 16052.

771. Ting J. T. [и др.]. Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. № 1 (104). С. 353–358.

772. Toledo J. B. [и др.]. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre // *Brain*. 2013. № 9 (136). С. 2697–2706.

773. Tong L. -Amyloid Peptide at Sublethal Concentrations Downregulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Functions in Cultured Cortical Neurons // *Journal of Neuroscience*. 2004. № 30 (24). С. 6799–6809.

774. Tong L. -Amyloid Peptide at Sublethal Concentrations Downregulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Functions in Cultured Cortical Neurons // *Journal of Neuroscience*. 2004. № 30 (24). С. 6799–6809.

775. Toppala S. [и др.]. Midlife Insulin Resistance as a Predictor for Late-Life Cognitive Function and Cerebrovascular Lesions // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019. № 1 (72). С. 215–228.

776. Torre J. C. de la Cerebral Hypoperfusion, Capillary Degeneration, and Development of Alzheimer Disease: // *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 2000. № Supplement (14). С. S72–S81.

777. Torre J. C. de la Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics // *The Lancet Neurology*. 2004. № 3 (3). С. 184–190.

778. Townsend K. P. [и др.]. Proinflammatory and vasoactive effects of Abeta in the cerebrovasculature // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002. (977). С. 65–76.

779. Tramutola A. [и др.]. Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD // *Journal of Neurochemistry*. 2015. № 5 (133). С. 739–749.

780. Tramutola A. [и др.]. Proteomic identification of altered protein O-GlcNAcylation in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease // *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2018. № 10 (1864). С. 3309–3321.

781. Tramutola A. [и др.]. Brain insulin resistance triggers early onset Alzheimer disease in Down syndrome // *Neurobiology of Disease*. 2020. (137). С. 104772.

782. Trinchese F. [и др.]. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease // *Journal of Clinical Investigation*. 2008. № 8 (118). С. 2796–2807.

783. Tsai H.-H. [и др.]. Distribution of Lacunar Infarcts in Asians With Intracerebral Hemorrhage: A Magnetic Resonance Imaging and Amyloid Positron Emission Tomography Study // *Stroke*. 2018. № 6 (49). С. 1515–1517.

784. Tumminia A. [и др.]. Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. № 11 (19). С. 3306.

785. Tuttle A. H. [и др.]. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice // *Nature Methods*. 2018. № 12 (15). С. 994–996.

786. Twig G. [и др.]. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy // *The EMBO Journal*. 2008. № 2 (27). С. 433–446.

787. Tye K. M. [и др.]. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour // *Nature*. 2013. № 7433 (493). С. 537–541.

788. Tyumentsev M. A. [и др.]. Mitochondrial Dysfunction as a Predictor and Driver of Alzheimer's Disease-Like Pathology in OXYS Rats // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018. № 3 (63). С. 1075–1088.

789. Ujiie M. [и др.]. Blood-Brain Barrier Permeability Precedes Senile Plaque Formation in an Alzheimer Disease Model // *Microcirculation*. 2003. № 6 (10). С. 463–470.

790. Ulfert G., Schmidt U., Hoyer S. Glucose and Energy Metabolism of Rat Cerebral Cortex During Aging *Experimental Brain Research Supplementum* / под ред. S. Hoyer, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1982. С. 102–111.

791. Unoki H., Yamagishi S. Advanced Glycation End Products and Insulin Resistance // *Current Pharmaceutical Design*. 2008. № 10 (14). С. 987–989.

792. Uscio L. V. d', He T., Katusic Z. S. Expression and Processing of Amyloid Precursor Protein in Vascular Endothelium // *Physiology*. 2017. № 1 (32). С. 20–32.

793. Uwechue N. M. [и др.]. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes: Glutamine release from perisynaptic astrocytes // *The Journal of Physiology*. 2012. № 10 (590). С. 2317–2331.

794. Vallée A. [и др.]. Thermodynamics in Neurodegenerative Diseases: Interplay Between Canonical WNT/Beta-Catenin Pathway–PPAR Gamma, Energy Metabolism and Circadian Rhythms // *NeuroMolecular Medicine*. 2018. № 2 (20). С. 174–204.

795. Van Dam D. [и др.]. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition: Behavioral testing of the APP23 model // *European Journal of Neuroscience*. 2003. № 2 (17). С. 388–396.
796. Vandal M. [и др.]. Insulin Reverses the High-Fat Diet-Induced Increase in Brain A and Improves Memory in an Animal Model of Alzheimer Disease // *Diabetes*. 2014. № 12 (63). С. 4291–4301.
797. Vannucci S. J. [и др.]. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes // *Brain Research*. 1998. № 1 (797). С. 1–11.
798. Venegas C. [и др.]. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease // *Nature*. 2017. № 7685 (552). С. 355–361.
799. Verdile G. [и др.]. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease // *Mediators of Inflammation*. 2015. (2015). С. 1–17.
800. Vicent D. [и др.]. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance // *Journal of Clinical Investigation*. 2003. № 9 (111). С. 1373–1380.
801. Vijayan M. [и др.]. *Molecular Links and Biomarkers of Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer's Disease* Elsevier, 2017. С. 95–126.
802. Vijayan M., Reddy P. H. *Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer's Disease: Molecular Links* // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016. № 2 (54). С. 427–443.
803. Vlassenko A. G. [и др.]. Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. № 41 (107). С. 17763–17767.
804. Volloch V., Olsen B., Rits S. *Alzheimer's Disease is Driven by Intraneuronally Retained Beta-Amyloid Produced in the AD-Specific, β APP-Independent Pathway: Current Perspective and Experimental Models for Tomorrow* // *Annals of Integrative Molecular Medicine*. 2019. № 1 (2). С. 90–114.

805. Walsh D. M. [и др.]. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo // *Nature*. 2002. № 6880 (416). С. 535–539.

806. Wang B. [и др.]. Isoform-specific knockout of FE65 leads to impaired learning and memory // *Journal of Neuroscience Research*. 2004. № 1 (75). С. 12–24.

807. Wang D. V. [и др.]. Neurons in the Amygdala with Response-Selectivity for Anxiety in Two Ethologically Based Tests // *PLoS ONE*. 2011. № 4 (6). С. e18739.

808. Wang J., Markesbery W. R., Lovell M. A. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment // *Journal of Neurochemistry*. 2006. № 3 (96). С. 825–832.

809. Wang J.-Z., Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons // *Progress in Neurobiology*. 2008. № 2 (85). С. 148–175.

810. Wang P. [и др.]. VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011. № 3 (411). С. 620–626.

811. Wang Y. [и др.]. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2019. № 7 (25). С. 816–824.

812. Warmke N. [и др.]. 186 Reduced pericyte insulin signalling causes abnormal developmental angiogenesis // *Heart*. 2017. № Suppl 5 (103). С. A127–A128.

813. Watson G. S., Craft S. Insulin resistance, inflammation, and cognition in Alzheimer's Disease: Lessons for multiple sclerosis // *Journal of the Neurological Sciences*. 2006. № 1–2 (245). С. 21–33.

814. Weinstein G. [и др.]. Association of metformin, sulfonylurea and insulin use with brain structure and function and risk of dementia and Alzheimer's disease: Pooled analysis from 5 cohorts // *PLOS ONE*. 2019. № 2 (14). С. e0212293.

815. Werther G. A. [и др.]. Localization and Characterization of Insulin Receptors in Rat Brain and Pituitary Gland Using *in Vitro* Autoradiography and Computerized Densitometry* // *Endocrinology*. 1987. № 4 (121). С. 1562–1570.

816. Westerman M. A. [и др.]. The Relationship between A β and Memory in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease // *The Journal of Neuroscience*. 2002. № 5 (22). С. 1858–1867.

817. White M. F. Insulin Signaling in Health and Disease // *Science*. 2003. № 5651 (302). С. 1710–1711.

818. Willette A. A. [и др.]. Association of Insulin Resistance With Cerebral Glucose Uptake in Late Middle–Aged Adults at Risk for Alzheimer Disease // *JAMA Neurology*. 2015. № 9 (72). С. 1013.

819. Wimo A. [и др.]. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010 // *Alzheimer's & Dementia*. 2017. № 1 (13). С. 1–7.

820. Winkler E. A. [и др.]. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration // *Nature Neuroscience*. 2015. № 4 (18). С. 521–530.

821. Winocur G. [и др.]. Memory impairment in obese Zucker rats: An investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. // *Behavioral Neuroscience*. 2005. № 5 (119). С. 1389–1395.

822. Wirths O., Zampar S. Neuron Loss in Alzheimer's Disease: Translation in Transgenic Mouse Models // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. № 21 (21). С. 8144.

823. Wolters F. J. [и др.]. Twenty-seven-year time trends in dementia incidence in Europe and the United States: The Alzheimer Cohorts Consortium // *Neurology*. 2020. № 5 (95). С. e519–e531.

824. Woodgett J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A // *The EMBO journal*. 1990. № 8 (9). С. 2431–2438.

825. Woods S. [и др.]. Insulin and the Blood-Brain Barrier // *Current Pharmaceutical Design*. 2003. № 10 (9). С. 795–800.

826. Wright J. W., Harding J. W. Contributions by the Brain Renin-Angiotensin System to Memory, Cognition, and Alzheimer's Disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019. № 2 (67). С. 469–480.

827. Wyss M. T. [и др.]. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2011. № 20 (31). С. 7477–7485.

828. Xi C. [и др.]. Theory of mind and decision-making processes are impaired in Parkinson's disease // *Behavioural Brain Research*. 2015. (279). С. 226–233.

829. Xiang Y., Xu G., Weigel-Van Aken K. A. K. Lactic Acid Induces Aberrant Amyloid Precursor Protein Processing by Promoting Its Interaction with Endoplasmic Reticulum Chaperone Proteins // *PLoS ONE*. 2010. № 11 (5). С. e13820.

830. Xiao N.-A. [и др.]. Reduction of Glucose Metabolism in Olfactory Bulb is an Earlier Alzheimer's Disease-related Biomarker in 5XFAD Mice // *Chinese Medical Journal*. 2015. № 16 (128). С. 2220–2227.

831. Xing S. [и др.]. Early induction of oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease with heme oxygenase activity // *Molecular Medicine Reports*. 2014. № 2 (10). С. 599–604.

832. Xu Z.-P. [и др.]. Biomarkers for Early Diagnostic of Mild Cognitive Impairment in Type-2 Diabetes Patients: A Multicentre, Retrospective, Nested Case–Control Study // *EBioMedicine*. 2016. (5). С. 105–113.

833. Yamada K. [и др.]. Improvement by nefiracetam of β -amyloid-(1-42)-induced learning and memory impairments in rats: Nefiracetam and β -amyloid-induced memory deficits // *British Journal of Pharmacology*. 1999. № 1 (126). С. 235–244.

834. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes // *Experimental Gerontology*. 2011. № 4 (46). С. 217–224.

835. Yamaguchi Y. [и др.]. Effects of a Novel Cognitive Enhancer, Spiro[imidazo-[1,2-*a*]pyridine-3,2-indan]-2(3*H*)-one (ZSET1446), on Learning

Impairments Induced by Amyloid- β_{1-40} in the Rat // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006. № 3 (317). С. 1079–1087.

836. Yamamoto M. [и др.]. Endothelial Adora2a Activation Promotes Blood–Brain Barrier Breakdown and Cognitive Impairment in Mice with Diet-Induced Insulin Resistance // *The Journal of Neuroscience*. 2019. № 21 (39). С. 4179–4192.

837. Yan J.-J. [и др.]. Protection against β -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid: *In vivo* protection against b-amyloid toxicity with ferulic acid // *British Journal of Pharmacology*. 2001. № 1 (133). С. 89–96.

838. Yang J. [и др.]. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. № 33 (111). С. 12228–12233.

839. Yao J. [и др.]. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. № 34 (106). С. 14670–14675.

840. Yao J., Diaz Brinton R. Targeting Mitochondrial Bioenergetics for Alzheimers Prevention and Treatment // *Current Pharmaceutical Design*. 2011. № 31 (17). С. 3474–3479.

841. Yao Z.-G. [и др.]. Co-location of HDAC2 and Insulin Signaling Components in the Adult Mouse Hippocampus // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2012. № 8 (32). С. 1337–1342.

842. Yarchoan M. [и др.]. Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies // *Acta Neuropathologica*. 2014. № 5 (128). С. 679–689.

843. Yeatman H., Albiston A., Chai S. P3-477: Insulin-regulated aminopeptidase in astrocytes: Role in Alzheimer's disease? // *Alzheimer's & Dementia*. 2011. (7). С. S668–S668.

844. Yeatman H. R. [и др.]. Forebrain neurone-specific deletion of insulin-regulated aminopeptidase causes age related deficits in memory // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2016. (136). С. 174–182.

845. Yeh T.-Y. J. [и др.]. Insulin-stimulated exocytosis of GLUT4 is enhanced by IRAP and its partner tankyrase // *The Biochemical Journal*. 2007. № 2 (402). С. 279–290.
846. Yetkin F. Z. [и др.]. FMRI of working memory in patients with mild cognitive impairment and probable Alzheimer's disease // *European Radiology*. 2006. № 1 (16). С. 193–206.
847. Yong K. [и др.]. A longitudinal investigation of the relationship between crowding and reading: A neurodegenerative approach // *Neuropsychologia*. 2016. (85). С. 127–136.
848. You Y. [и др.]. Tau as a mediator of neurotoxicity associated to cerebral amyloid angiopathy // *Acta Neuropathologica Communications*. 2019. № 1 (7). С. 26.
849. Young A. L. [и др.]. A data-driven model of biomarker changes in sporadic Alzheimer's disease // *Brain*. 2014. № 9 (137). С. 2564–2577.
850. Yu J.-T., Tan L., Hardy J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update // *Annual Review of Neuroscience*. 2014. № 1 (37). С. 79–100.
851. Yu L.-Y., Pei Y. Insulin Neuroprotection and the Mechanisms // *Chinese Medical Journal*. 2015. № 7 (128). С. 976–981.
852. Yu Y., Kastin A. J., Pan W. Reciprocal Interactions of Insulin and Insulin-Like Growth Factor I in Receptor-Mediated Transport across the Blood-Brain Barrier // *Endocrinology*. 2006. № 6 (147). С. 2611–2615.
853. Zakharova I. O. [и др.]. The Protective Effect of Insulin on Rat Cortical Neurons in Oxidative Stress and Its Dependence on the Modulation of Akt, GSK-3beta, ERK1/2, and AMPK Activities // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. № 15 (20). С. 3702.
854. Zamarian L., Weiss E. M., Delazer M. The Impact of Mild Cognitive Impairment on Decision Making in Two Gambling Tasks // *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*. 2011. № 1 (66B). С. 23–31.

855. Zeng Y., Zhang L., Hu Z. Cerebral insulin, insulin signaling pathway, and brain angiogenesis // *Neurological Sciences*. 2016. № 1 (37). С. 9–16.

856. Zhang F. [и др.]. Early Candidate Urine Biomarkers for Detecting Alzheimer's Disease Before Amyloid- β Plaque Deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 Transgenic Mouse Model // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018. № 2 (66). С. 613–637.

857. Zhang X. [и др.]. The Early Events That Initiate β -Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018. (10). С. 359.

858. Zhang Y. [и др.]. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex // *Journal of Neuroscience*. 2014. № 36 (34). С. 11929–11947.

859. Zhang Y. [и др.]. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse // *Neuron*. 2016. № 1 (89). С. 37–53.

860. Zhang Y. [и др.]. Neuroprotective effect of ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment induced by isoflurane anesthesia in aged rats via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects mediated by the PI3K/AKT/GSK-3 β pathway // *Molecular Medicine Reports*. 2016. № 3 (14). С. 2778–2784.

861. Zhang Y. [и др.]. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3 β as a potential link // *Behavioural Brain Research*. 2018. (339). С. 57–65.

862. Zhang Y. [и др.]. Effect of intraperitoneal or intracerebroventricular injection of streptozotocin on learning and memory in mice // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018. № 3 (16). С. 2375–2380.

863. Zhao W. [и др.]. Brain Insulin Receptors and Spatial Memory // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 49 (274). С. 34893–34902.

864. Zhao W. [и др.]. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors // *The FASEB Journal*. 2008. № 1 (22). С. 246–260.

865. Zhao W.-Q. [и др.]. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory // *European Journal of Pharmacology*. 2004. № 1–3 (490). С. 71–81.

866. Zhao W.-Q. [и др.]. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory // *European Journal of Pharmacology*. 2004. № 1–3 (490). С. 71–81.

867. Zheng C., Liu Z. Vascular function, insulin action, and exercise: an intricate interplay // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015. № 6 (26). С. 297–304.

868. Zheng R. [и др.]. Selenomethionine promoted hippocampal neurogenesis via the PI3K-Akt-GSK3 β -Wnt pathway in a mouse model of Alzheimer's disease // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. № 1 (485). С. 6–15.

869. Zheng W. [и др.]. Disrupted Regional Cerebral Blood Flow, Functional Activity and Connectivity in Alzheimer's Disease: A Combined ASL Perfusion and Resting State fMRI Study // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. (13). С. 738.

870. Zhou Z. [и др.]. Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases // *Cells*. 2018. № 12 (7). С. 229.

871. Zhu X. [и др.]. Activation and redistribution of c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease // *Journal of Neurochemistry*. 2001. № 2 (76). С. 435–441.

872. Zick Y. The Insulin Receptor: Structure and Function // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1989. № 3 (24). С. 217–269.

873. Zick Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance // *Biochemical Society Transactions*. 2004. № 5 (32). С. 812–816.

874. Ziegler D. [и др.]. Deficits in systemic biomarkers of neuroinflammation and growth factors promoting nerve regeneration in patients with type 2 diabetes and polyneuropathy // *BMJ open diabetes research & care*. 2019. № 1 (7). С. e000752.

875. Zimmer E. R. [и др.]. [18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport // *Nature Neuroscience*. 2017. № 3 (20). С. 393–395.

876. Zlokovic B. V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders // *Nature Reviews Neuroscience*. 2011. № 12 (12). С. 723–738.

877. Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research под ред. М. L. Andersen, S. Tufik, Cham: Springer International Publishing, 2016.

878. Topics in Biomedical Gerontology под ред. S. Prasad, P. C. Rath, R. Sharma, 1st ed. 2017-е изд., Singapore: Springer Singapore : Imprint: Springer, 2017.

1 с.