

*На правах рукописи*



**Баширзаде Алим Асиф оглы**

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ  
РАЗВИТИЯ И КОРРЕКЦИИ КОГНИТИВНЫХ ДЕФИЦИТОВ НА  
НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА  
У МЫШЕЙ**

3.3.3. Патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (г. Новосибирск)

**Научный руководитель:**

**Амстиславская Тамара Геннадьевна** – доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией трансляционной биопсихиатрии ФГБНУ «НИИ нейронаук и медицины» (г. Новосибирск)

**Официальные оппоненты:**

**Салмина Алла Борисовна** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии отдела молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» (г. Москва)

**Иванова Светлана Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной генетики и биохимии Научно-исследовательского института психического здоровья Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск)

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург)

**Защита диссертации состоится** 4 апреля 2023 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.242.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2. Тел. 8(383)-333-64-56

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте <https://frcftm.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



**Пальчикова Н.А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** С увеличением продолжительности жизни населения резко возросла распространенность тяжелых когнитивных дефицитов, вызванных нейродегенеративными заболеваниями, поэтому в настоящее время деменция пожилых лиц является одной из актуальнейших проблем современной медицины, отмеченной в программе ВОЗ по заполнению пробелов в области охраны психического здоровья (mhGAP). Наиболее частой причиной деменции в пожилом возрасте является болезнь Альцгеймера (БА) (60-70% всех случаев). На сегодняшний день не существует эффективных методов лечения БА, а используемые лишь снижают выраженность симптомов. Успех терапии БА напрямую связан с углубленным пониманием нейрофизиологических и молекулярно-генетических механизмов, определяющих это заболевание (Тихонова, 2018).

Моделирование БА представляет собой весьма нетривиальную задачу. Существующие нейротоксические модели БА основаны на центральном введении различных фрагментов амилоида в головной мозг мышей. Актуальным и нерешенным вопросом остается определение предпочтительной области введения амилоидных фрагментов в мозг, в зависимости от чего могут быть запущены разные патофизиологические процессы, вовлеченные в когнитивные нарушения, такие как особенности накопления эндогенного А $\beta$ , течение воспалительной реакции и аутофагии.

Аутофагия представляет собой физиологический процесс внутриклеточной деградации в аутолизосомах частично денатурировавших белков, а дефекты в системе аутофагии являются важными звеньями амилоидного каскада и патогенеза БА (Espinet et al., 2015). Стимуляция аутофагосомного и лизосомального потоков может рассматриваться как перспективный терапевтический подход в лечении БА. Рапамицин как индуктор mTOR-зависимого пути и трегалоза как индуктор mTOR-независимого пути обладают разными механизмами активации аутофагии, но как эти два сигнальных пути будут модулировать аутофагический ответ еще предстоит выяснить.

Еще одним перспективным направлением в поиске новых терапевтических подходов БА является патогенетическая терапия молекулами, имеющими в составе бета-лактамное кольцо. Цефтриаксон (Цеф) – цефалоспориновый антибиотик III поколения продемонстрировал способность восстанавливать когнитивные дефициты у мышей на фармакологической модели болезни Паркинсона и у крыс OXYS, представляющих селекционную модель спорадической формы БА (Puryshev et al., 2019). Вопрос о способности Цеф снижать накопление амилоида и показатели нейровоспаления, восстанавливать различные типы когнитивных нарушений у мышей на нейротоксической модели БА остается открытым.

**Степень разработанности темы исследования.** Олигомеры А $\beta$  вызывают различные типы синаптических дефектов, что в конечном итоге приводит к гибели нейронов и клинической картине деменции. Введение олигомеров ами-

лоида бета, полученные из фрагмента 25-35 (A $\beta$ O25-35) в боковые желудочки головного мозга крыс вызывало нарушение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (Delobette et al., 1997).

Процесс аутофагии регулируется mTOR (mammalian target of rapamycin)-зависимым и mTOR-независимым путями, которые поддаются химическим воздействиям (Sarkar, 2013). Было идентифицировано несколько небольших молекул, модулирующих аутофагию, имеющие потенциальное терапевтическое применение при БА. Показано, что в культуре клеток трегалоза снижала секрецию A $\beta$ , тормозила деградацию APP и его C-концевого фрагмента в эндолизосомном компартменте (Tien et al., 2016). На трансгенной модели гиперэкспрессии белка предшественника A $\beta$  у мышей длительное лечение рапамицином снижало уровень патогенного белка и восстанавливало когнитивные реакции запоминания и обучения (Spilman et al., 2010).

Патогенез БА включает нейровоспаление, сопровождающееся эксайтотоксичностью глутамата. Показано, что Цеф снижает глутаматную эксайтотоксичность, модулируя экспрессию глутаматного транспортера GLT-1 (Zumkehr et al., 2015). Известны данные клинических испытаний Цеф в качестве нейропротекторного средства при боковом амиотрофическом склерозе или деменции при болезни Паркинсона (Cudkowicz et al., 2014).

**Цель работы:** исследование патофизиологических и патоморфологических коррелятов когнитивных дефицитов и методов их коррекции индукторами аутофагии и цефтриаксоном у мышей с центральным введением олигомеров амилоида бета.

**Задачи:**

1. Сравнить когнитивные дефициты, накопление A $\beta$ , показатели нейровоспаления, плотность нейронов и активацию аутофагии в структурах головного мозга у мышей C57BL/6 при введении олигомеров амилоида бета (A $\beta$ O25-35) в боковые желудочки мозга или в гиппокамп.
2. Исследовать когнитивные дефициты, накопление A $\beta$ , плотность нейронов, активацию микроглии во фронтальной коре, миндалевидном комплексе и гиппокампе (CA1, CA3 области, зубчатая извилина) мышей при индукции mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии после центрального введения A $\beta$ O25-35.
3. Оценить когнитивные дефициты, накопление A $\beta$ , плотность нейронов, активацию микроглии во фронтальной коре и гиппокампе (CA1, CA3 области, зубчатая извилина) мышей при патогенетической коррекции цефтриаксоном после центрального введения A $\beta$ O25-35.

**Научная новизна.** Получены новые данные о развитии нейровоспаления при интрацеребровентрикулярном (ИЦВ) и интрагиппокампальном (ИГ) введении A $\beta$ O25-35. При ИЦВ введении A $\beta$ O25-35 происходит активация экспрессии генов провоспалительных маркеров: гена маркера активации астроглии *Lcn2* и гена маркера активации микроглии *Aif1* в гиппокампе и миндалине. Оценен вклад совместной активации аутофагии в коррекцию когнитивных нарушений на нейротоксической модели БА у мышей. Впервые показан положительный

кумулятивный эффект индукторов mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии на анксиогенный эффект введения A $\beta$ O25-35 и его отсутствие на когнитивные функции. Изолированная активация mTOR-зависимой аутофагии рапамицином и mTOR-независимой аутофагии трегалозой приводила к снижению накопления A $\beta$ , инактивации микроглии в структурах мозга, повышению латентного времени перехода в тесте пассивного избегания, что свидетельствует о восстановлении когнитивных дефицитов на нейротоксической модели БА. Выявлены новые аспекты воздействия цефтриаксона в восстановлении нарушенных A $\beta$ O25-35 когнитивных функций и показателей нейровоспаления, заключающиеся в восстановлении пространственной памяти, снижении показателя клеточной адгезии CD54 во фронтальной коре и гиппокампе мышей.

**Теоретическая и научно-практическая значимость работы.** Выявленные в настоящей работе специфические особенности проявления воспалительной реакции и аутофагии после введения A $\beta$ O25-35 в боковые желудочки и в область гиппокампа способствуют более глубокому пониманию течения и взаимодействия патофизиологических процессов при нейродегенеративных заболеваниях. Обнаруженные в работе позитивные эффекты применения индукторов аутофагии и цефтриаксона могут являться экспериментальным обоснованием возможности разработки новых подходов лечения БА в клинике.

**Методология и методы исследования.** Диссертационная работа проделана на базе Института нейронаук и медицины. Экспериментальное исследование выполнено на лабораторных мышьях линии C57BL/6, которые, после центрального введения им олигомеров амилоида бета, представляют собой модель патофизиологических процессов, происходящих при БА. Методологическую основу работы составляют методы автоматизированного поведенческого анализа, нейроморфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований, а также анализа и синтеза информации из научной литературы.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Введение A $\beta$ O25-35 как в боковые желудочки, так и в гиппокамп мышьям C57BL/6 нарушает долговременную ассоциативную память о страхе, увеличивает накопление амилоида, активирует микроглию в различных структурах мозга. Внутрижелудочковое, но не внутригиппокампальное введение вызывает повышение экспрессии гена маркера активации астроглии *Lcn2* и гена маркера активации микроглии *Aif1* в гиппокампе и миндалине.
2. Активация как mTOR-зависимой (рапамицин), так и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии восстанавливает когнитивные нарушения у мышьям с введением A $\beta$ O25-35 в боковые желудочки, снижает накопление A $\beta$ , активацию микроглии в структурах мозга мышьям.
3. Цефтриаксон снижает нейровоспаление, накопление A $\beta$  в структурах мозга, восстанавливает когнитивные нарушения, обусловленные внутрижелудочковым введением A $\beta$ O25-35.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством экспериментального материала, применением современных методов исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам, а также выбором адекватных критериев статистической обработки результатов. Основные результаты по теме диссертационного исследования представлены и обсуждены на внутри- и межлабораторных семинарах Научно-исследовательского института нейронаук и медицины, а также на Российской конференции с международным участием «Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддиктивных расстройств» (г. Томск, 2020), III Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (г. Новосибирск, 2022), 13-ой Международной мультиконференции «Биоинформатика регуляции генома и структурная/системная биология» (г. Новосибирск, 2022).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (в том числе 3 публикации в журналах, индексируемых Scopus, Web of Science), 5 публикаций в сборниках международных, всероссийских и региональных научно-практических конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 22 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель содержит 228 источников.

**Вклад автора.** Основные результаты были получены автором самостоятельно. Личный вклад автора диссертации заключается в непосредственном планировании и постановке экспериментальных серий, интерпретации и обсуждении результатов, написании отчетов и статей. Самостоятельно были произведены стереотаксические введения Аβ, проведены поведенческие тесты, выполнен анализ данных с помощью статистических методов, построены графики с помощью программного кода на R. Совместно с д.б.н. Беличенко В.М. определены уровни экспрессии генов, совместно с м.н.с. Акопян А.А. и к.б.н. Овсюковой М.В. проведены иммуногистохимические и нейроморфологические исследования.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Животные и экспериментальные группы.** Экспериментальные процедуры проведены в соответствии с рекомендациями руководства по уходу и использованию лабораторных животных Института исследований лабораторных животных и одобрены локальным этическим комитетом НИИНМ. В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 (возраст 2 мес., 20–25 г),

полученных из вивария НИИНМ. Животных содержали в стандартных условиях (цикл свет-темнота: 14 ч света и 10 ч темноты, температура: 20–22 °С, относительная влажность: 50–60%), со свободным доступом к воде и корму. Все манипуляции выполняли в световой фазе цикла дня. Мыши содержались по 5-6 особей в клетке.

В эксперименте № 1, посвященному анализу поведения, нейроморфологическим и нейрофизиологическим коррелятам при введении АβO25-35 в боковые желудочки и в гиппокамп головного мозга мыши были разделены на 5 групп (n=15 для каждой группы): 1) «Интактные» - мыши, которым не производилась инъекция; 2) «Раст\_ИЦВ» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки головного мозга; 3) «Раст\_ИГ» - двухстороннее введение растворителя в область зубчатой извилины гиппокампа; 4) «Аβ\_ИЦВ» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки головного мозга; 5) «Аβ\_ИГ» - двухстороннее введение АβO25-35 в область зубчатой извилины гиппокампа. Через 1 месяц после центрального введения АβO25-35 тестировали поведение в тестах открытого поля и пассивного избегания в течение недели. На следующий день биопробы забирали на определение генной экспрессии (n=10) и иммуногистохимическое исследование (n=5).

В эксперименте № 2 оценивали эффекты активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии. Мыши были разделены на семь групп (n=10–17 для каждой группы): 1) «Контроль» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки головного мозга (ИЦВ); 2) «Аβ» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки; 3) «Аβ\_Трег» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки и ежедневное потребление 2% раствора трегалозы с питьевой водой; 4) «Аβ\_Рап» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки и введение 10 мг/кг рапамицина, внутрибрюшинно (в/б), 7 раз через день; 5) «Аβ\_Рап\_Трег» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки, введение 10 мг/кг рапамицина, в/б, 7 раз через день и ежедневное потребление 2% раствора трегалозы с питьевой водой; 6) «Аβ\_Рап\_Трег\_3-МА» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки, введение 10 мг/кг рапамицина, в/б, 7 раз через день, ежедневное потребление 2% раствора трегалозы с питьевой водой и введение 3-метиладенина 15 мг/кг, в/б, 7 раз через день, за 1 ч до введения рапамицина; 7) «Аβ\_3-МА» - двухстороннее введение АβO25-35 в боковые желудочки и введение 3-метиладенина 15 мг/кг, в/б, 7 раз через день. Применение рапамицина, трегалозы или 3-метиладенина начинали через 2 дня после стереотаксической операции в течение 2 недель. Спустя сутки после последнего введения препарата с 16-ого по 30-й день проводили поведенческое тестирование. На 32 день производили забор биологического материала для анализа экспрессии генов (n=5-12) и нейроморфологического исследования (n=5).

В эксперименте № 3 исследовали эффекты цефалоспоринового антибиотика цефтриаксона на когнитивные дефициты, накопление Аβ, показатели нейровоспаления, плотность нейронов у мышей с центральным введением АβO25-35 в боковые желудочки мозга. Мышей делили на четыре группы (n=15–20 в

каждой): 1) «Раст\_Физ» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки головного мозга и в/б введение физиологического раствора (0,9 % раствор NaCl); 2) «Раст\_Цеф» - двухстороннее введение растворителя (стерильная вода) в боковые желудочки и в/б введение Цеф (100 мг/кг/день); 3) «Аβ\_Физ» - двухстороннее введение АβO25-35 и в/б введение физиологического раствора; 4) «Аβ\_Цеф» – двухстороннее введение АβO25-35 и в/б введение Цеф. Стереотаксическая операция была проведена мышам в день 0. Физ. раствор и цефтриаксон вводили в течение 36 дней, начиная со 2-ого дня после стереотаксической операции. Часть мышей (n=7–8) из каждой группы тестировали в установке Intellicage с 1-ого по 28-й день. Остальных мышей (n=8–16) тестировали в Т-образном лабиринте, тесте открытого поля и тесте пассивного избегания через 2 недели после операции (ИЦВ введение АβO25-35, день 0). Т-образный лабиринт на 15-17 день, тест «Открытое поле» в день 27 и тест пассивного избегания на 34–36 дни. На 37 день были взяты биологические образцы для нейроморфологического и иммуногистохимического исследований (n=5).

**Введение АβO25-35 в головной мозг мышей.** Олигомеры бета-амилоидных фрагментов человека АβO25-35 вводили билатерально в боковые желудочки по 5 мкг в 5 мкл (ИЦВ), либо в гиппокамп по 2,5 мкг в 2,5 мкл (ИГ) с помощью моторизованного стереотаксиса Neurostar Stereo Drive (Neurostar, Германия). Координаты введения в желудочек: AP=-0,46 мм, ML=±0,9 мм, DV=2,5 мм. Координаты введения в гиппокамп: AP = -2,06 мм, ML = ± 1,3 мм, DV = 2 мм (Song et al., 2016).

**Тестирование поведения животных. Тест пассивного избегания** проводили в соответствии с протоколом (Dubrovina et al, 2005) в системе GEMINI™ Avoidance System (San Diego Instruments, США). 1-й день - габитуация; 2-й день - обучение (при заходе в темный отсек мышь получала удар током силой 0,5 мА); 3-й день - тестирование (в течение 3 минут, регистрировали латентное время перехода в темный отсек). В качестве показателя памяти, обусловленной боязнью наказания, использовали латентное время перехода в темное помещение в день обучения и в день тестирования.

**Тест «Открытое поле».** Этот тест проводился согласно протоколу (Pupyshev et al., 2019). Исследовали общую двигательную активность (пройденное расстояние, см), тревожность (время нахождения в центре арены, с), исследовательское поведение (количество вертикальных стоек, n) и эмоциональность (количество актов дефекации, n).

**Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»** выполняли в соответствии с протоколом (Walf and Frye, 2007) с небольшими изменениями. Мышь помещали на центральную платформу носом к закрытому рукаву и записывали ее поведение в течение 5 минут. Тревожность оценивали по времени, проведенному в открытых рукавах.

**Т-образный лабиринт** проводили по протоколу спонтанных чередований (Deacon and Rawlins, 2006). Процент правильных выборов принимался за показатель рабочей памяти.



Поведение животных в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Г-образный лабиринт» регистрировали с помощью боковой и верхней цифровых видеокамер, а обработку и анализ видеозаписей проводили с помощью программного обеспечения EthoVision XT 10.1 (Noldus, Нидерланды).

**Система Intellicage** (TSE System, Германия) была использована для анализа условной реакции предпочтения места, переучивания реакции предпочтения места, условной реакции избегания места, угашения условной реакции избегания, патрулирования у мышей в соответствии с протоколом (Kiryk et al., 2020).

**Для нейроморфологического исследования** мышей усыпляли в камере с CO<sub>2</sub>. Транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем 4% параформальдегидом в PBS. Мозг быстро удаляли и постфиксировали в PBS, содержащем 30% сахарозы, при 4°C. После погружения в заливку Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США), мозг замораживали и хранили при температуре -70 C до разделения на коронарные срезы вдоль лобной коры или гиппокампа мозга толщиной 30 мкм на криостате HistoSafe MicroCut – SADV (Китай). Окрашивание по Нисслю проводили по стандартной процедуре (Paxinos and Franklin, 2019). Изображение было получено и проанализировано с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония), соединенного с камерой Nikon DS-Fi2 (Nikon, Япония) и программным обеспечением Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, CA, США). Плотность нейронов измеряли полуколичественным методом (Tikhonova et al., 2017).

**Иммуногистохимическое исследование** проводили по протоколу (Puryshev et al., 2019). Флюоресцентные изображения были получены с помощью микроскопа AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Германия) и затем проанализированы в программном обеспечении Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, CA, USA). Интенсивность флюоресценции, связанную с экспрессией специфических белков, измеряли как оптическую плотность с поправкой на фон, с вычитанием сигналов окрашивания неиммунореактивных областей на изображениях, преобразованных в оттенки серого.

**Анализ экспрессии генов** проводили с помощью количественной ПЦР методом построения стандартной кривой (Ginzinger, 2002). Относительное количество тестируемой комплементарной ДНК (кДНК) определяли с использованием калибровочных кривых, полученных из разведений стандартной кДНК. Значение экспрессии для целевого гена нормализовали к среднему геометрическому уровню мРНК референсных генов.

**Статистический анализ.** Данные анализировали с помощью пакета программ Statistica v.10 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения данных определяли с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Данные с нормальным распределением анализировали с помощью F критерия Фишера, t критерия Стьюдента с поправками Бонферрони в случае множественных сравнений. Апостериорные post hoc тесты применялись в модификации по Тьюки и LSD-тест. Данные с ненормальным распределением анализировали с помощью H

критерия Краскела-Уоллиса, U-критерия Манна–Уитни с поправками Бонферрони в случае множественных сравнений. Коэффициенты корреляции рассчитаны по методу Спирмена. Коробчатые диаграммы построены с помощью программного кода на R и представлены в виде боксов с усами. Столбчатые диаграммы представлены в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего. Статистически значимым считали уровень  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Сравнение когнитивных дефицитов, накопления A $\beta$ , показателей нейровоспаления, плотности нейронов, активации аутофагии в структурах мозга мышей при введении A $\beta$ O25-35 в боковые желудочки мозга или в гиппокамп

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора введения амилоида на латентное время перехода в темный отсек в день тестирования ( $F(1,63) = 77,71, p < 0,001$ ), но не влияние фактора места инъекции амилоида ( $F(1,63) = 0,8, p > 0,05$ ) и взаимодействия факторов ( $F(1,63) = 0,13, p > 0,05$ ). У мышей, составляющих группы с амилоидом («A $\beta$ \_ИЦВ» и «A $\beta$ \_ИГ») показан дефицит воспроизведения реакции в день тестирования (Рис. 1) по сравнению с соответствующими группами растворителя («Раст\_ИЦВ» и «Раст\_ИГ»), согласно *post hoc* тесту по Тьюки. Таким образом, мыши, получавшие A $\beta$ O25-35, независимо от области введения, хуже формировали ассоциацию между контекстом экспериментальной установки и опасностью темного отсека, где они накануне получали болезненное наказание.

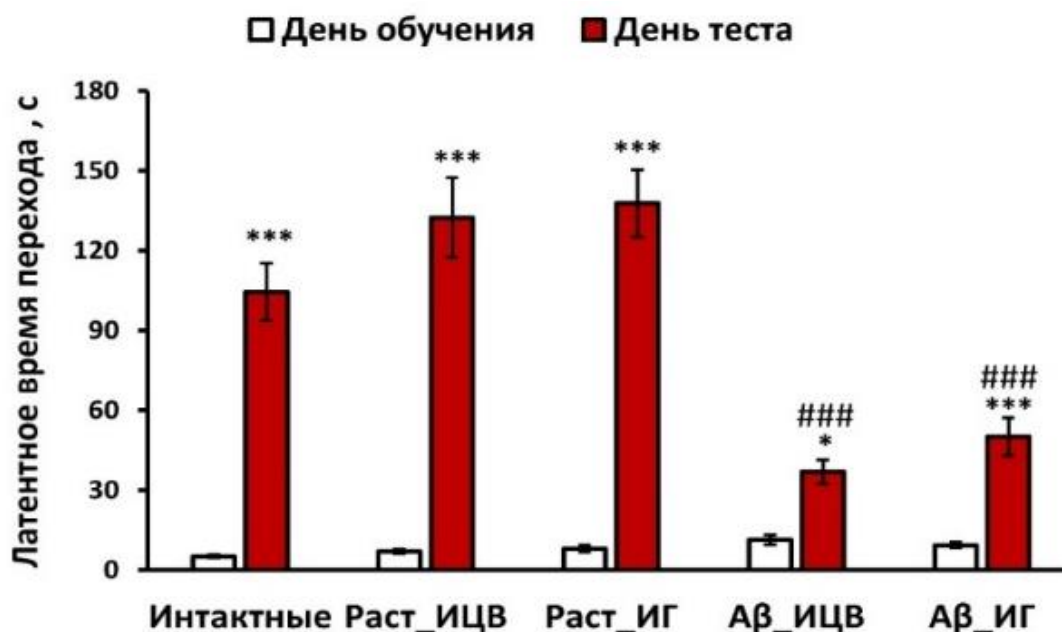


Рисунок 1. Влияние введения A $\beta$ O25-35 ИЦВ или ИГ на показатель памяти и обучения в тесте условного пассивного избегания у мышей C57BL/6. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с уровнем в день обучения; ###  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст\_ИЦВ» и «Раст\_ИГ»).

Нарушение поведения у мышей с введением амилоида (группы «Аβ\_ИЦВ» и «Аβ\_ИГ») сопровождалось увеличением накопления амилоида не только в исследованных областях гиппокампа, но и во фронтальной коре, куда амилоид не вводили (Рис. 2). Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым именно неокортекс является областью, в которой раньше всего начинают откладываться отложения Аβ (Thal et al, 2002).

Показаны межгрупповые различия между экспериментальными группами в СА1 зоне гиппокампа ( $F(4,14) = 12,17, p < 0,001$ ), СА3 зоне гиппокампа ( $F(4,14) = 12,54, p < 0,001$ ), зубчатой извилине гиппокампа ( $F(4,14) = 6,38, p < 0,01$ ), во фронтальной коре ( $F(4,14) = 29,35, p < 0,001$ ).

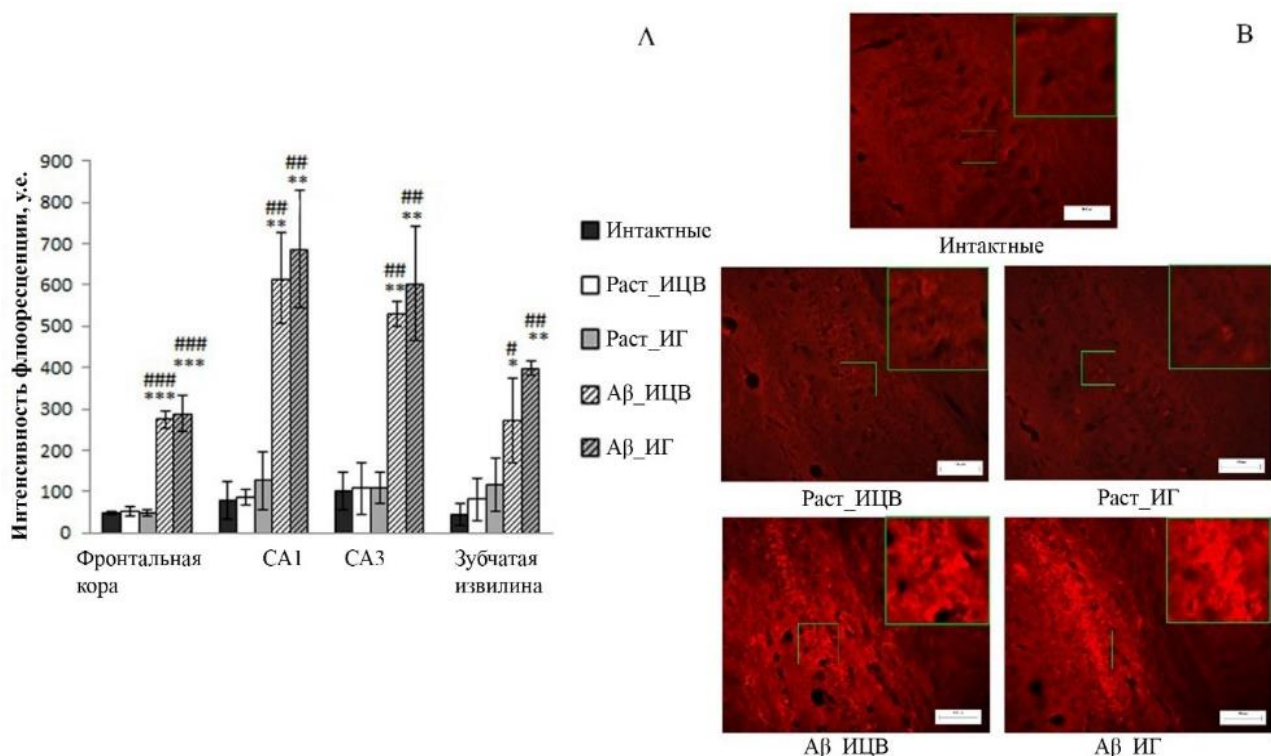


Рисунок 2. Влияние ИЦВ или ИГ введения Аβ<sub>25-35</sub> на накопление Аβ во фронтальной коре, зонах СА1, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа головного мозга мышей линии С57ВL/6. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Интakтные»; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  ###  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст\_ИЦВ» и «Раст\_ИГ»).

Накопление Аβ положительно коррелировало с активацией микроглии в виде увеличения экспрессии белка IBA1 в зоне СА1 гиппокампа ( $r_s = 0,72, p < 0,01$ ) и во фронтальной коре ( $r_s = 0,8, p < 0,001$ ) мышей, которым центрально вводили Аβ<sub>25-35</sub> (Рис. 3), что свидетельствует о развитии нейровоспаления в исследованных областях.

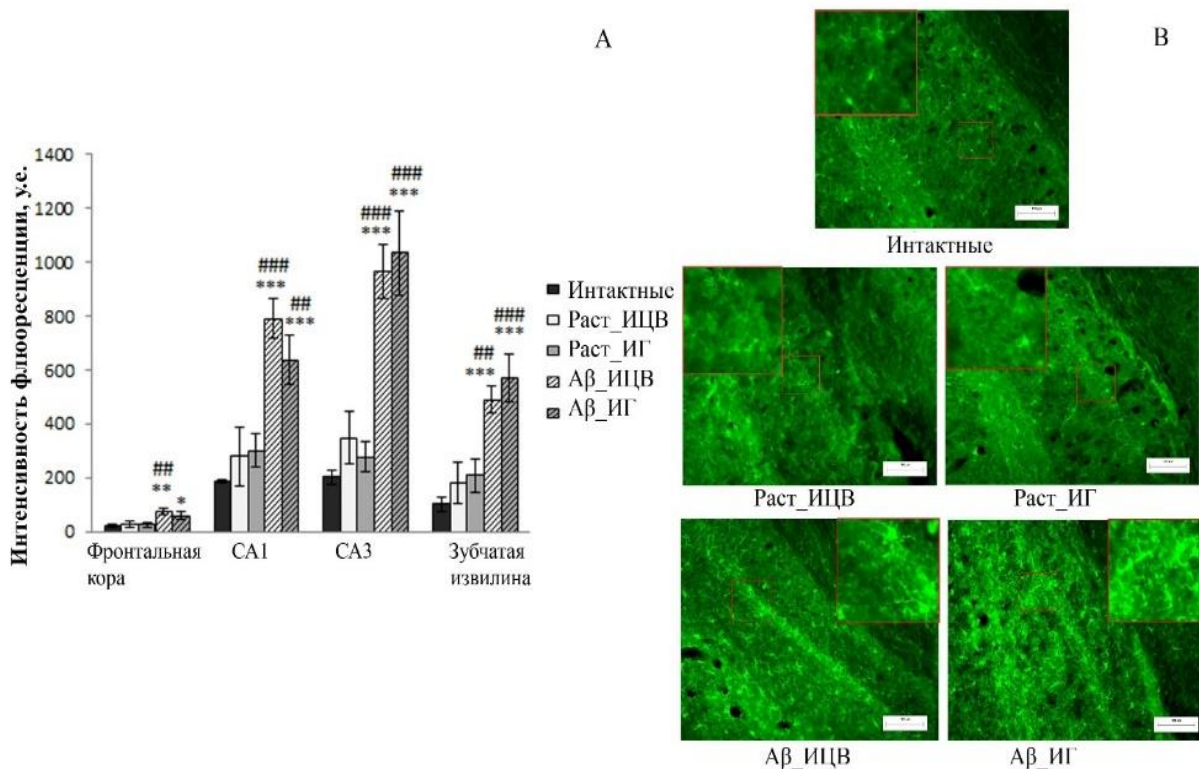


Рисунок 3. Влияние ИЦВ или ИГ введения Аβ<sub>025-35</sub> на активацию микроглии во фронтальной коре, зоне СА1, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа мышей C57BL/6. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Интakтные»; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст\_ИЦВ» и «Раст\_ИГ»).

Данное заключение подтверждается увеличением в миндалине экспрессии гена *Aif1*, а в гиппокампе гена *Lcn2* в группе с ИЦВ введением амилоида («Аβ\_ИЦВ») по сравнению с интактными животными (Рис. 4). Увеличение содержания липокалина 2 ассоциируется с вовлечением астроцитов в воспалительные процессы (Mesquita et al, 2014), а также эпителия хориоидного сплетения в желудочках мозга и, вероятно, обеспечивающего повышение уровней мРНК гена *Lcn2* при ИЦВ введении.

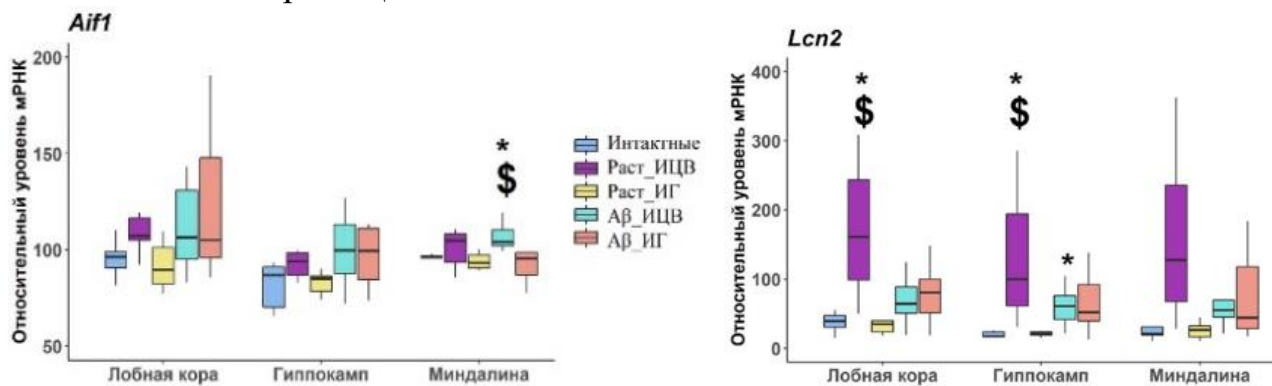


Рисунок 4. Влияние ИЦВ или ИГ введения Аβ<sub>025-35</sub> на уровни экспрессии мРНК генов *Aif1*, *Lcn2* в лобной коре, гиппокампе и миндалевидном теле мышей C57BL/6. \*  $p < 0,01$  по сравнению с интактной группой, \$  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Раст\_ИГ» с учетом поправок Бонферрони.

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил различий в экспрессии маркера плотности нейронов NEUN между группами ни во фронтальной коре, ни в СА1, ни в СА3 областях гиппокампа при ИЦВ и ИГ способах введения Аβ<sub>25-35</sub>, но выявил увеличение экспрессии маркера аутофагии LC3-II во фронтальной коре после ИГ введения по сравнению с интактными ( $F(4,11) = 5,31, p < 0,05$ ). Таким образом, введение Аβ<sub>25-35</sub> как в боковые желудочки, так и в гиппокамп мышам C57BL/6 нарушало долговременную ассоциативную память, увеличивало накопление амилоида, активировало микроглию во фронтальной коре и гиппокампе (СА1 и СА3 зоны). Выявлены и различия, связанные с областью введения Аβ<sub>25-35</sub> в мозг. При ИЦВ введении Аβ<sub>25-35</sub> происходит активация экспрессии гена маркера активации астроглии *Lcn2* и гена маркера активации микроглии *Aif1* в гиппокампе и миндалине.

## 2. Изучение эффектов совместной активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии в качестве терапевтического подхода у мышей с альцгеймероподобной патологией

В тесте пассивного избегания (Рис. 5) все способы терапии (рапамицин, трегалоза или их комбинация) улучшили дефицит обучения, о чем свидетельствует более длительное латентное время перехода по сравнению с группой с введением амилоида («Аβ»). Аддитивный терапевтический эффект совместного применения рапамицина и трегалозы в данном тесте отсутствовал.

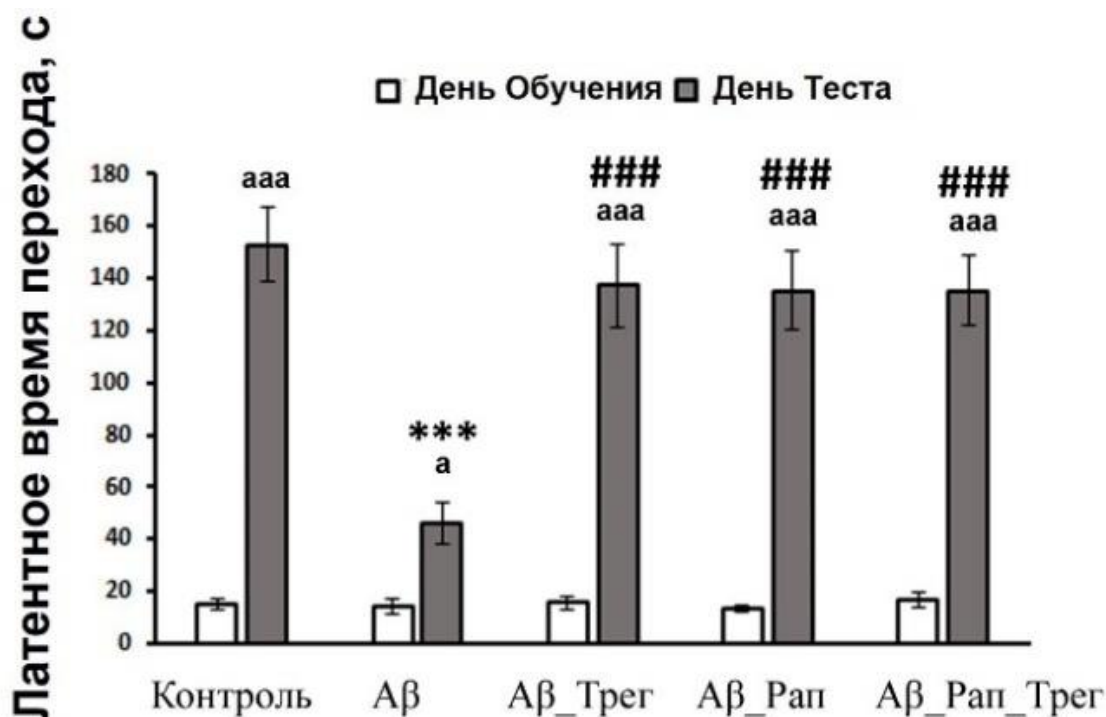


Рисунок 5. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации в тесте пассивного избегания у мышей на Аβ-индуцированной модели БА. а  $p < 0,05$ , aaa  $p < 0,001$  по сравнению со значениями в день обучения; \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Контроль»; ###  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Аβ».



Активацию аутофагии у мышей на Аβ-индуцированной модели исследовали во фронтальной коре, СА1, СА3, зубчатой извилине, амигдале (Рис. 6). Отмечено увеличение флуоресценции LC3-II после использования трегалозы по сравнению с группой Аβ во фронтальной коре, зоне СА3 гиппокампа. Рапамицин в используемой дозе не изменял экспрессию LC3-II ни в одной из исследуемых структур. Совместное же применение рапамицина и трегалозы увеличило уровень экспрессии LC3-II до максимальных значений во всех исследуемых структурах у мышей на Аβ-индуцированной модели БА.

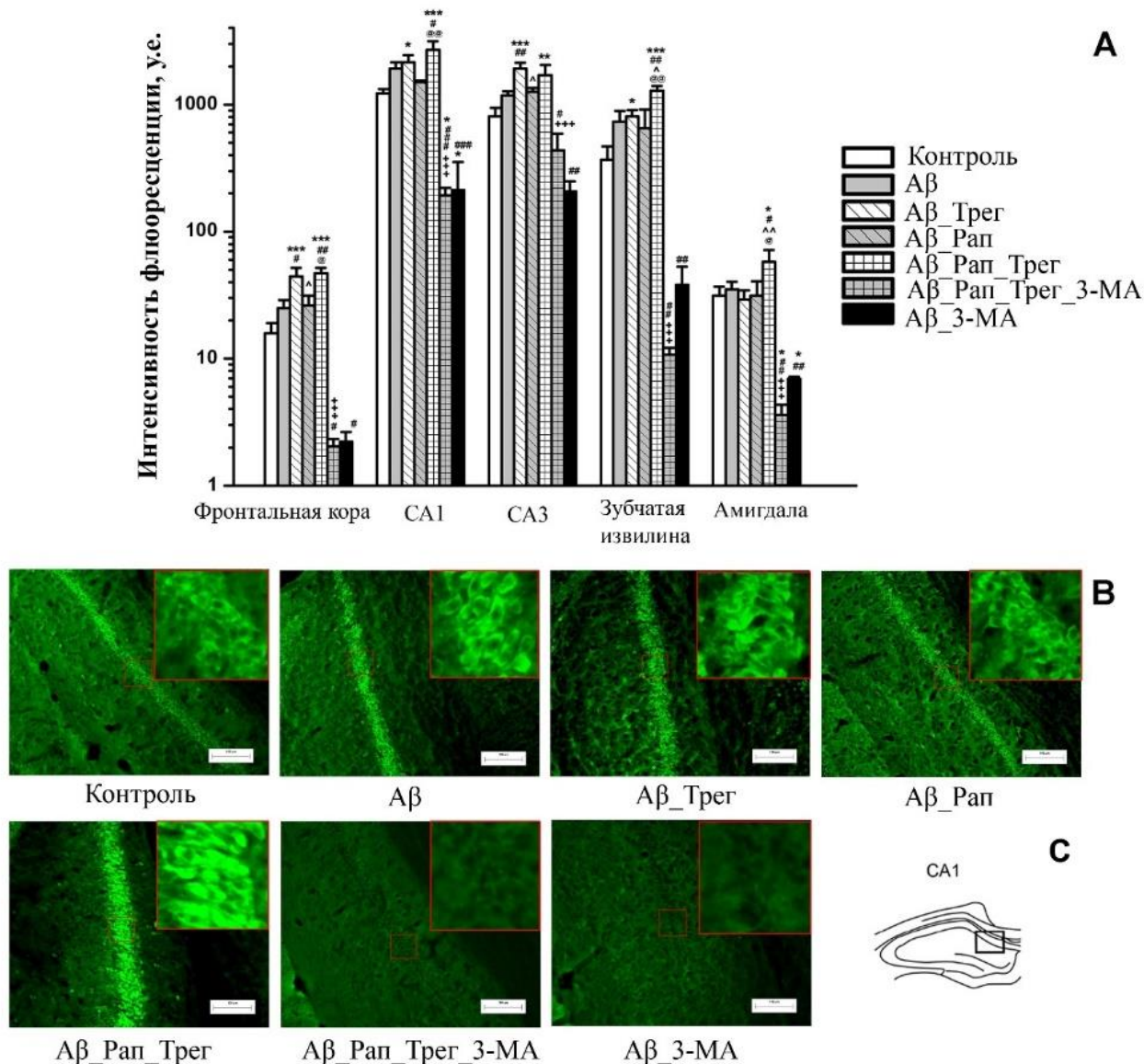


Рисунок 6. Влияние рапамицина, трегалозы, 3-метиладенина или их комбинации на активность аутофагии в структурах мозга мышей. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Контроль»; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Аβ»; ^  $p < 0,05$ , ^^  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Аβ\_Трег»; @  $p < 0,05$ , @@  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Аβ\_Рап»; +++  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Аβ\_Рап\_Трег».

Важным вопросом в изучении терапевтического эффекта индукторов аутофагии была их способность влиять на накопление амилоида в мозге мы-

шей. Накопление  $A\beta$  было достоверно снижено под действием трегалозы, рапамицина или их комбинированного применения (Рис. 7). Однако, эффект изолированного или совместного применения достоверно не отличался.

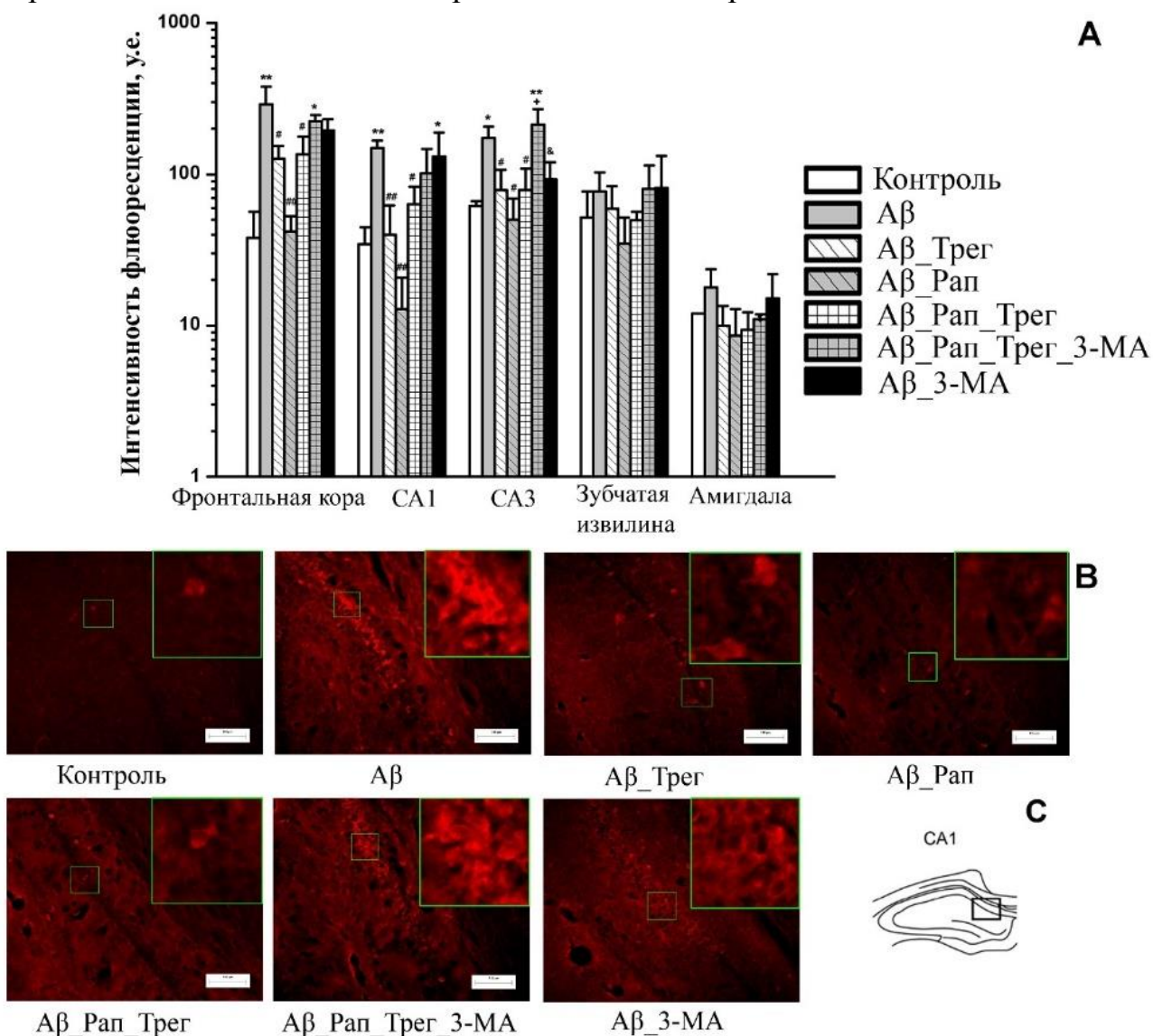


Рисунок 7. Влияние рапамицина, трегалозы, 3-метиладенина или их комбинации в отношении накопления  $A\beta$ . \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Контроль»; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  по сравнению с группой « $A\beta$ »; +  $p < 0,05$  по сравнению с группой « $A\beta$ \_Рап\_Трег»; &  $p < 0,05$  по сравнению с группой « $A\beta$ \_Рап\_Трег\_3-МА».

Рапамицин и трегалоза по отдельности или в комбинации в равной степени ослабляли активацию микроглии в исследуемых структурах мозга у мышей, получавших  $A\beta_{O25-35}$ , что свидетельствует об их противовоспалительных свойствах (Рис. 8).

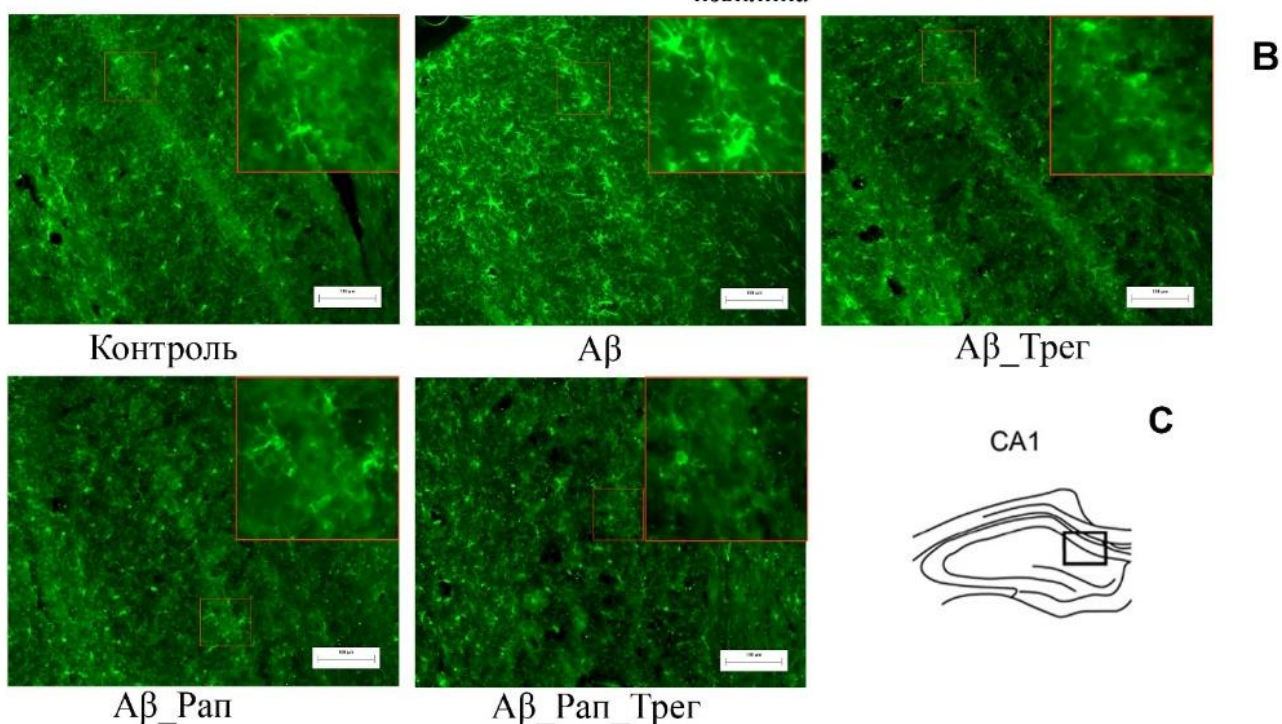
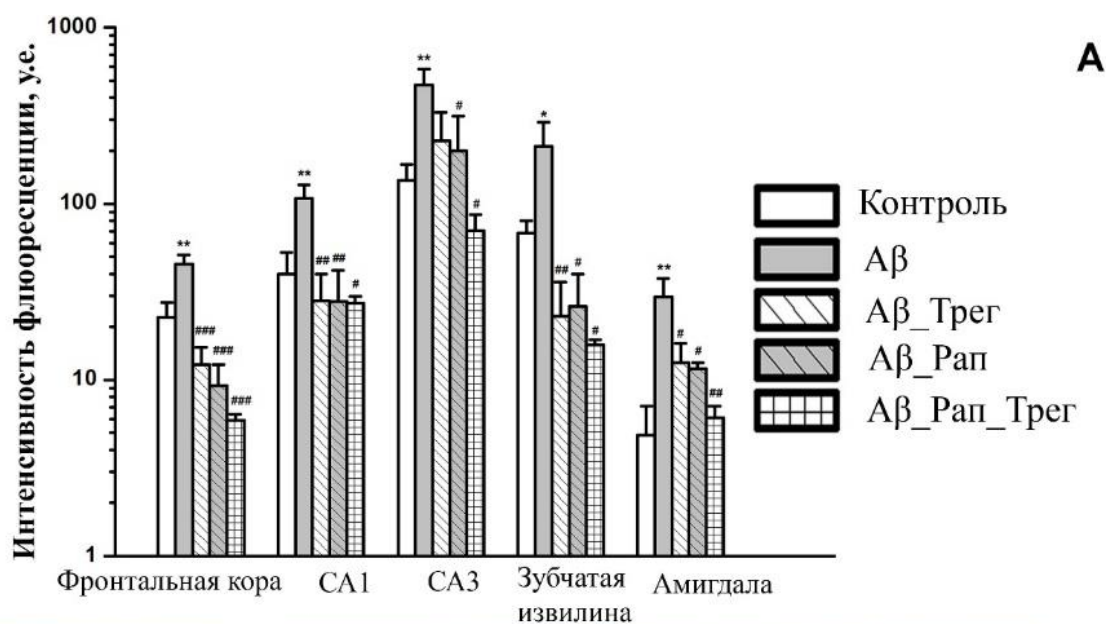


Рисунок 8. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации на экспрессию IBA1. \*  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль»; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Aβ».

Таким образом, выявлен дифференциальный вклад как отдельной, так и совместной активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии в коррекцию поведенческих нарушений, накопление Aβ, активацию микроглии у мышей с альцгеймероподобной патологией. Раздельная активация оказалась эффективной в восстановлении когнитивных нарушений у мышей, снижении накопления Aβ, активации микроглии в структурах мозга, а совместная активация эффективно снижала тревожность мышей и усиливала экспрессию маркера аутофагии LC3-II в зубчатой извилине гиппокампа и миндалевидном комплексе.



### 3. Влияние цефалоспоринового антибиотика цефтриаксона на когнитивные дефициты, накопление Аβ, показатели нейровоспаления, плотность нейронов у мышей с центральным введением АβO25-35 в боковые желудочки мозга

Цефтриаксон (100 мг/кг/день, 36 дней) восстанавливал нарушенную Аβ долговременную ассоциативную память у мышей в тесте **пассивного избегания**. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил влияние фактора Цеф ( $F(1,17) = 5,2, p < 0,05$ ) на латентное время перехода мышей в темную зону в день тестирования. В тесте **Т-образный лабиринт** процент правильных выборов в группе с введением амилоида и цефтриаксона («Аβ\_Цеф») был выше, чем в группе с введением амилоида и физ. раствора («Аβ\_Физ»), свидетельствуя о способности Цеф улучшать кратковременную рабочую память мышей (Рис. 9F).

Дополнительно, мышей протестировали в системе Intellicage, предназначенной для автоматического мониторинга поведенческого профиля мышей в течение длительного периода времени, в условиях домашней клетки, без каких-либо стрессирующих манипуляций экспериментатора. Выявлен протективный эффект Цеф на пространственную память мышей в группе с введением амилоида и цефтриаксона («Аβ\_Цеф») в первый день теста **условной реакции предпочтения места** (Рис. 9А). Под влиянием Цеф процент правильных посещений у них не снижался, тогда как в группе с введением амилоида и физ. раствора («Аβ\_Физ») был существенно ниже по сравнению с контрольными мышами, получающими растворитель и физ. раствор («Раст\_Физ»). Как видно из Рис. 9В, наибольшая разница в процентном отношении правильных посещений между мышами из группы «Аβ\_Физ» и мышами из группы «Раст\_Физ» была в течение периода 3–6 часов первого дня. На 2–5-й день показано увеличение процента правильных посещений, по сравнению с первым днем (периодом обучения) мышей всех экспериментальных групп, что свидетельствовало об их равной способности к обучению.

Отсутствие влияния Цеф показано в отношении когнитивной гибкости в тесте **переучивания условной реакции предпочтения места** (Рис. 9С), долговременной ассоциативной памяти в тесте **условного избегания** (Рис. 9D), исполнительного контроля, рабочей памяти, когнитивной гибкости в тесте **на патрулирование** (Рис. 9Е), осуществленных в системе Intellicage.

Выявленные неоднозначные эффекты Цеф на долговременную ассоциативную память мышей при использовании классического теста условного избегания и теста, проведенного в системе Intellicage, можно объяснить различиями в силе и характере используемых безусловных стимулов. Так, в камере Gemini безусловным стимулом, предъявляемый животным, является удар электрическим током, который сопровождается выработкой убедительной ассоциативной связи, даже после однократного сеанса. В системе Intellicage аверсивным стимулом был поток воздуха, который хоть и вызывал негативные эмоции, но не обладал достаточной модальностью для выработки устойчивой связи.

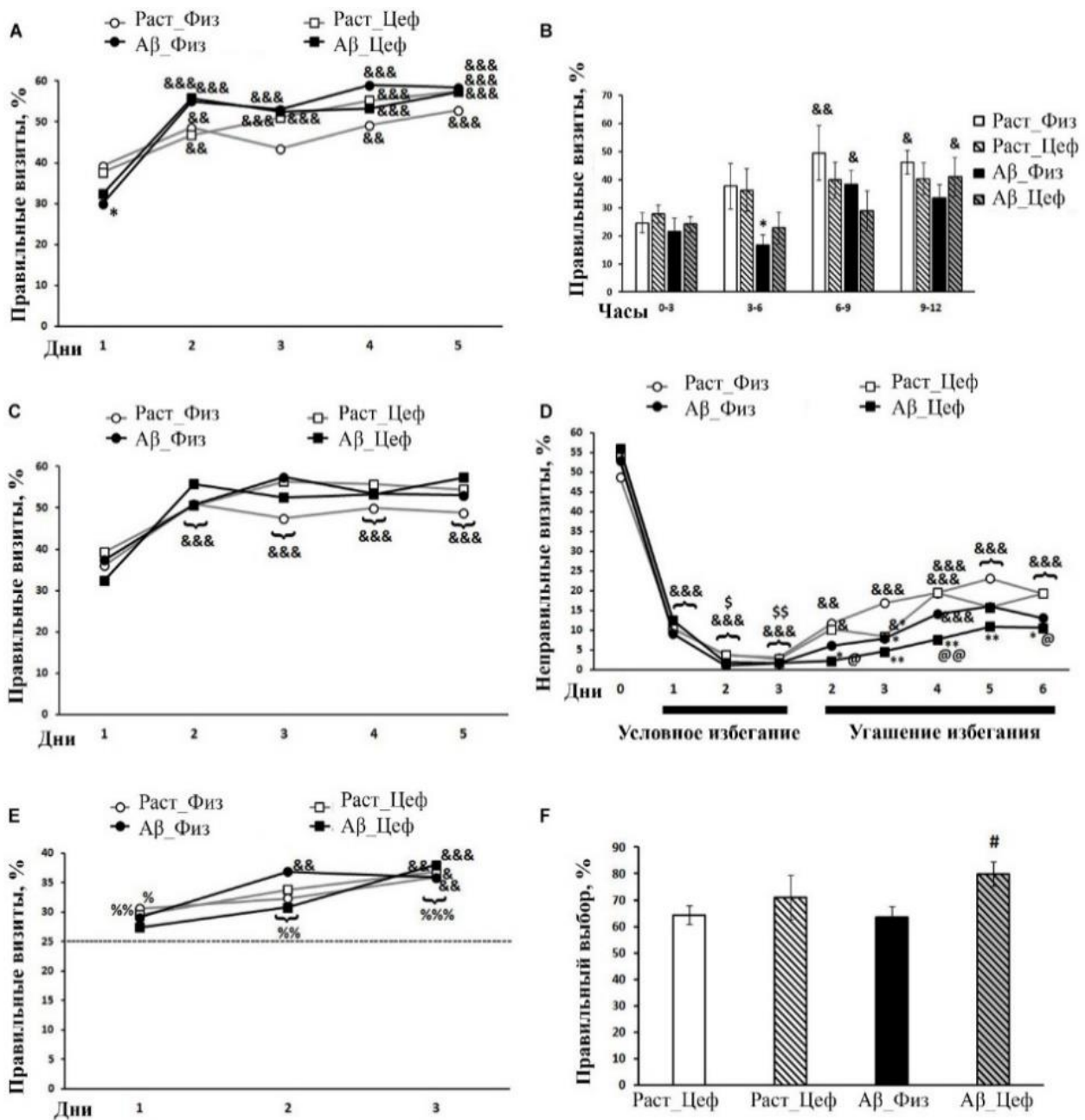


Рисунок 9. Влияние введения Цеф и Aβ<sub>25–35</sub> на когнитивный профиль в системе IntelliCage (A-E) и в Т-образном лабиринте (F) на мышах. &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,01$ , &&&  $p < 0,001$  по сравнению со значениями той же группы в первую временную точку фазы; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  по сравнению со значениями, полученными в той же группе в первый день теста условного избегания; %  $p < 0,05$ , %%  $p < 0,01$ , %%%  $p < 0,001$  по сравнению с уровнем вероятности (25%); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующими значениями группы «Раст\_Физ»; #  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующими значениями группы «Aβ\_Физ»; @  $p < 0,05$ , @@  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующими значениями группы «Раст\_Цеф».

Улучшение когнитивного дефицита у мышей после терапии Цеф сопровождалось отсутствием изменений в плотности нейронов во фронтальной коре и гиппокампе, снижением накопления Aβ во фронтальной коре ( $F(1,8) = 30,1$ ,  $p$

< 0,001) и гиппокампе ( $F(1,8) = 9,5, p < 0,05$ ), активацией микроглии во фронтальной коре ( $F(1,10) = 17,53, p < 0,01$ ). Положительная корреляция между накоплением Аβ и экспрессией CD54 была обнаружена в СА3 зоне гиппокампа ( $r_{11} = 0,61, p < 0,05$ ). Цефтриаксон снижал экспрессию воспалительного маркера CD54 до уровня контрольных значений во фронтальной коре и гиппокампе (Рис. 10). Противовоспалительный эффект Цеф в основном связан с подавлением эксайтотоксичности глутамата, развивающейся при БА, за счет увеличения экспрессии GLT-1 – основного глутаматного транспортера в синапсах (Zumkehr et al, 2015). Помимо этого, воздействие Цеф на CD54 через NRF2 может влиять на белки семейства сиртуинов, известные своими противовоспалительными свойствами и способностью замедлять процессы старения (Xia et al, 2020).

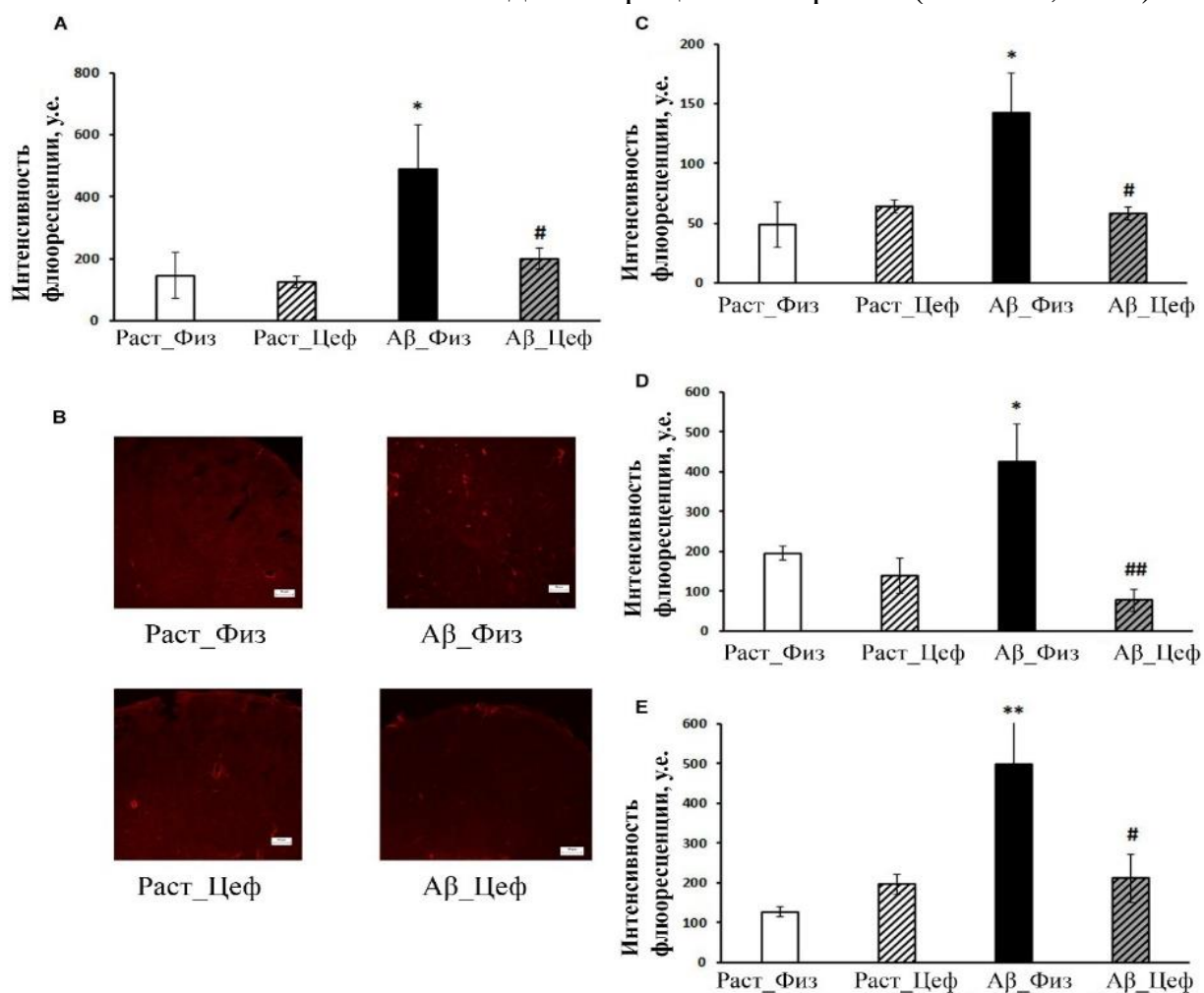


Рисунок 10. Влияние введения Цеф и Аβ<sub>25–35</sub> на экспрессию воспалительного маркера CD54 во фронтальной коре (А, В) или гиппокампе (С в области СА1; D в области СА3; Е в зубчатой извилине) у мышей. (А, С – Е). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Раст\_Физ»; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  по сравнению с группой «Аβ\_Физ».

Таким образом, выявлен терапевтический эффект цефтриаксона в восстановлении когнитивных нарушений, снижении повышенной экспрессии Аβ во фронтальной коре и гиппокампе, снижении экспрессии маркеров воспаления ИВА1 во фронтальной коре, CD54 во фронтальной коре, СА1, СА3 областях и в зубчатой извилине гиппокампа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На нейротоксической модели БА у мышей как ИЦВ (10 мкг), так и ИГ (5 мкг) билатеральное введение олигомеров Аβ вызывало нарушение когнитивных показателей, сопровождающееся сопоставимым накоплением Аβ и развитием нейровоспаления. Независимо от области введения, показано накопление амилоида во фронтальной коре, СА1, СА3, зубчатой извилине гиппокампа, высокозначимых для реализации когнитивных функций.

Повышение уровней мРНК гена *Lcn2* в коре и в гиппокампе более чем в 3 раза отчетливо проявилось в группе мышей с ИЦВ введением, что свидетельствует о более выраженной провоспалительной реакции по сравнению с ИГ введением. Выявленные особенности в экспрессии генов, обусловленных ИЦВ или ИГ введением АβO25-35, необходимо учитывать при экспериментальном исследовании различных аспектов БА.

Впервые на модели БА *in vivo* оценены терапевтические эффекты комбинированного воздействия индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы. Показан кумулятивный эффект индукторов mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии на анксиогенный эффект введения АβO25-35. Активация mTOR-зависимой аутофагии рапамицином и mTOR-независимой аутофагии трегалозой приводит к снижению накопления Аβ, противовоспалительному эффекту, восстановлению когнитивных нарушений мышей на нейротоксической модели БА. Полученные результаты могут быть использованы для разработки нового терапевтического подхода в клинической практике.

Результаты данного исследования подтверждают значимость молекул, имеющих в структуре бета-лактамовое кольцо, в качестве перспективного лечения когнитивных дефицитов на ранних стадиях БА. Показана патогенетически обоснованная коррекция цефтриаксоном когнитивных нарушений, которая характеризуется снижением накопления Аβ, нейровоспалительной реакции в мозге мышей и согласуется с предыдущими сообщениями о благотворном влиянии цефтриаксона на когнитивные нарушения у крыс на модели БА.

## ВЫВОДЫ

1. Введение АβO25-35 как в боковые желудочки, так и в гиппокамп мышам C57BL/6 нарушало долговременную ассоциативную память, увеличивало накопление амилоида, активировало микроглию во фронтальной коре и гиппокампе (СА1 и СА3 зоны). Показан провоспалительный эффект внутрижелудочкового, но не внутригиппокампального введения, отмеченного по повышению уровней мРНК гена *Lcn2* в гиппокампе и гена *Aif1* в амигдале.

2. Активация mTOR-зависимой и mTOR-независимой аутофагии восстанавливала когнитивные нарушения у мышей с введением АβO25-35 в боковые желудочки, снижала накопление Аβ, активацию микроглии во фронтальной коре и гиппокампе (СА1, СА3 области, зубчатая извилина) мышей. Показан кумулятивный эффект совместной активации аутофагии рапамицином и трегало-

зой на экспрессию маркера аутофагии LC3-II в зубчатой извилине гиппокампа и миндалевидном комплексе мышей.

3. Цефтриаксон восстанавливал нарушенную внутрижелудочковым введением A $\beta$ О25-35 долговременную ассоциативную память (тест пассивного избегания), кратковременную рабочую память (Т-образный лабиринт), пространственную память (система Intellicage) мышей, восстанавливал до контрольных значений повышенную экспрессию A $\beta$  во фронтальной коре, СА1 и СА3 областях гиппокампа, снижал экспрессию маркеров воспаления IBA1 во фронтальной коре, CD54 во фронтальной коре, СА1, СА3 областях и в зубчатой извилине гиппокампа.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Pupyshev, A. B., Belichenko, V. M., Tenditnik, M. V., **Bashirzade, A. A.**, Dubrovina, N. I., Ovsyukova, M. V., ... & Tikhonova, M. A. / Combined induction of mTOR-dependent and mTOR-independent pathways of autophagy activation as an experimental therapy for Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2022. – Т. 217. – С. 173406.
2. Tikhonova, M. A., Amstislavskaya, T. G., Ho, Y. J., Akopyan, A. A., Tenditnik, M. V., Ovsyukova, M. V., **Bashirzade, A. A.**, ... & Aftanas, L. I. / Neuroprotective effects of ceftriaxone involve the reduction of A $\beta$  burden and neuroinflammatory response in a mouse model of Alzheimer's disease // *Frontiers in Neuroscience*. – 2021. – С. 1219.
3. **Bashirzade, A. A.**, Zabegalov, K. N., Volgin, A. D., Belova, A. S., Demin, K. A., de Abreu, M. S., ... & Kalueff, A. V. / Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2022. – С. 104679.
4. Pupyshev, A. B., Tenditnik, M. V., Belichenko, V. M., Ovsyukova, M. V., Dubrovina, N. I., **Bashirzade, A. A.**, ... & Tikhonova, M. A. / Therapeutic efficacy of autophagy inducers rapamycin and trehalose in an animal model of Alzheimer's disease. // *ESGLD Workshop and Graduate course*. – 2019. – С. 55-55.
5. **Баширзаде, А. А.** / Экспериментальное исследование эффектов индукторов аутофагии (рапамицина и трегалозы) в терапии когнитивных нарушений у мышей на фармакологической модели болезни Альцгеймера. // *Международная научная студенческая конференция (МНСК-2020)*. – 2020. – С. 122-122.
6. Амстиславская, Т.Г., Тихонова, М.А., Акопян, А.А., **Баширзаде, А.А.**, Ying-Jui Ho. / Влияние цефтриаксона на нейрональный и поведенческий дефицит в анимальных моделях нейродегенеративных заболеваний // *Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддиктивных расстройств*. – 2020. – С. 5-6.
7. Tikhonova M.A., Belichenko V.M., **Bashirzade A.A.**, Tenditnik M.V., Amstislavskaya T.G. / Modulation of the expression of genes related to the neuroinflammation, autophagy, and neurodegeneration in the brain by the central administration of amyloid-beta in mice // *Высокопроизводительное секвенирование в геномике (HSG-2022)*. – 2022. – С. 89-89.

8. **Bashirzade A.**, Pupyshev A., Belichenko V., Tenditnik M., Dubrovina N., Ovsyukova M., Akopyan A., Amstislavskaya T., Tikhonova M. / Combined treatment with autophagy inducers rapamycin and trehalose as an experimental therapy for Alzheimer's disease-like pathology in mice // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022)*. – 2022. – С. 731-731.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Аβ – амилоид-бета

АβO25-35 – олигомеры амилоида бета, полученные из фрагмента 25-35.

БА – болезнь Альцгеймера

ИЦВ – интрацеребровентрикулярное введение

ИГ – интрагиппокампальное введение

Цеф – цефтриаксон

*Aif1* - allograft inflammatory factor 1, ген аллотрансплантантного воспалительного белка 1

IBA1 - ionized calcium-binding adapter molecule 1, адаптерная молекула 1, связывающая ионизированный кальций

LC3 – microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, белок аутофагии  
MAP1LC3B

*Lcn2* - lipocalin 2, ген белка липокалин 2

mTOR - mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих

Соискатель Баширзаде А.А.

