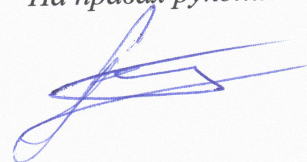


Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Амстиславская Тамара Геннадьевна

Новосибирск – 2023

Оглавление

Список сокращений.....	3
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	10
1.1. Болезнь Альцгеймера в свете современных представлений.....	10
1.2. Современные подходы к лечению болезни Альцгеймера.....	15
1.3. Нарушения памяти и обучения при нейродегенерации.....	18
1.4. Роль аутофагии при нейродегенерации.....	20
1.5. Вклад нейровоспаления в развитие нейродегенерации.....	24
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	31
2.1. Животные.....	31
2.2. Дизайн экспериментов.....	31
2.3. Введение А β О25-35 в головной мозг.....	34
2.4. Тестирование поведения животных.....	35
2.5. Нейроморфологическое исследование.....	40
2.6. Анализ экспрессии генов.....	41
2.7. Статистический анализ.....	42
Глава 3. Результаты исследования.....	44
3.1. Сравнение когнитивных дефицитов, накопления А β , показателей нейровоспаления, плотности нейронов, активации аутофагии в структурах мозга мышей при введении А β О25-35 в боковые желудочки мозга или в гиппокамп.....	44
3.2. Изучение эффектов совместной активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии в качестве терапевтического подхода у мышей на нейротоксической модели БА.....	53
3.3. Влияние цефалоспоринового антибиотика цефтриаксона на когнитивные дефициты, накопление А β , показатели нейровоспаления, плотность нейронов у мышей с центральным введением А β О25-35 в боковые желудочки мозга.....	65
Глава 4. Обсуждение результатов.....	74
Заключение.....	89
Выводы.....	90
Список использованной литературы.....	91

Список сокращений

A β – амилоид бета

A β O25-35 – олигомеры амилоида бета, полученные из короткого фрагмента 25-35.

БА – болезнь Альцгеймера

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ИЦВ – интрацеребровентрикулярное введение

ИГ – интрагиппокампальное введение

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Цеф – цефтриаксон

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

APP – amyloid precursor protein, белок предшественник амилоида

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

NRF2 - nuclear factor erythroid 2- (NF-E2-) related factor 2, фактор 2, связанный с ядерным эритроидным фактором

TFEB - transcription factor EB, транскрипционный фактор EB

3xTG-AD – тройная мутация на трансгенной линии мышей модели БА (APP KM670/671NL, MAPT P301L, PSEN1 M146V)

Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. 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 [1].

Доминирующей гипотезой патогенеза БА является концепция «амилоидного каскада». Согласно данной концепции, ключевым моментом в запуске патологических нейродегенеративных процессов при БА считается чрезмерное накопление и агрегация амилоида бета ($A\beta$) [2, 3]. Множество физиологических функций $A\beta$ [4] не позволяют рассматривать данный белок только как нейротоксический продукт метаболизма белка-предшественника амилоида (APP). 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 $A\beta$, течение воспалительной реакции и аутофагии.

Аутофагия представляет собой физиологический процесс внутриклеточной деградации частично денатурировавших белков, а дефекты в системе аутофагии являются важными звеньями амилоидного каскада и патогенеза БА [5]. Так, при БА наблюдается накопление незрелых аутофагосом и нарушение слияния их с лизосомами [6]. Следовательно, 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-лактамно 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 [7, 8]. Вопрос о способности Цеф снижать накопление амилоида и показатели нейровоспаления у мышей на нейротоксической модели БА остается открытым.

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 А β , показатели нейровоспаления, плотность нейронов и активацию аутофагии в структурах головного мозга у мышей C57BL/6 при введении олигомеров амилоида бета (A β O25-35) в боковые желудочки мозга или в гиппокамп.
2. Исследовать когнитивные дефициты, накопление А β , 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 β O25-35.
3. Оценить когнитивные дефициты, накопление А β , плотность нейронов, активацию микроглии во фронтальной коре и гиппокампе (CA1, CA3 области, зубчатая извилина) мышей при патогенетической коррекции цефтриаксоном после центрального введения A β O25-35.

Научная новизна

Получены новые данные о развитии нейровоспаления при интрацеребровентрикулярном (ИЦВ) и интрагиппокампальном (ИГ) введении A β O25-35. При ИЦВ введении A β 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 β O25-35 и его отсутствие на когнитивные функции. Изолированная активация mTOR-зависимой аутофагии рапамицином и mTOR-независимой аутофагии трегалозой приво-

дила к снижению накопления А β , 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 А β 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 А β 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 мышах линии C57BL/6, которые, после центрального введения им олигомеров амилоида бета, представляли 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 А β O25-35 как в боковые желудочки, так и в гиппокамп мышам 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 мышей с введением А β O25-35 в боковые желудочки, снижает накопление А β , активацию микроглии в структурах мозга мышей.

3. Цефтриаксон снижает нейровоспаление, накопление А β в структурах мозга, восстанавливает когнитивные нарушения, обусловленные внутрижелудочковым введением А β 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 мультikonференции «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.

1. Pupyshev, A. B., Belichenko, V. M., Tenditnik, M. V., **Bashirzade, A. A.**, Dubrovina, N. I., Ovsyukova, M. V., ... & Tikhonova, M. A. (2022). 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*, 173406, DOI: 10.1016/j.pbb.2022.173406.
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. (2021). Neuroprotective Effects of Ceftriaxone Involve the Reduction of A β Burden and Neuroinflammatory Response in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 1219, DOI: 10.3389/fnins.2021.736786.
3. **Bashirzade, A. A.**, Zabegalov, K. N., Volgin, A. D., Belova, A. S., Demin, K. A., de Abreu, M. S., ... & Kalueff, A. V. (2022). Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 104679, DOI: 10.1016/j.neubiorev.2022.104679.

4. Pupyshev, A. B., Tenditnik, M. V., Belichenko, V. M., Ovsyukova, M. V., Dubrovina, N. I., **Bashirzade, A. A.**, ... & Tikhonova, M. A. (2019). Therapeutic efficacy of autophagy inducers rapamycin and trehalose in an animal model of Alzheimer's disease. In 22nd ESGLD Workshop and Graduate course (с. 55).
5. **Баширзаде, А. А.** (2020). Экспериментальное исследование эффектов индукторов аутофагии (рапамицина и трегалозы) в терапии когнитивных нарушений у мышей на фармакологической модели болезни Альцгеймера. МНСК-2020. Биология (с. 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. Материалы Российской конференции с международным участием «Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддиктивных расстройств». Сборник тезисов. Томск - 2020 С. 5-6. ISBN 978-5-6044235-5-4.
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 central administration of amyloid-beta in mice. High-throughput Sequencing in Genomics. Novosibirsk, 2022. III Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», 19-24 июня 2022 г. Новосибирск, С. 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): The Thirteenth International Multiconference (04–08 July 2022, Novosibirsk, Russia); Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2022. – 1148 с. – ISBN 978-5-91291-059-3. – DOI 10.18699/BGRS/SB-2022-000

Личный 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.

Структура и объем диссертации

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

Благодарности

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю д.б.н. Амстиславской Тамаре Геннадьевне за бесценные советы как на научном поприще, так и в жизни. Особую признательность автор выражает своим научным учителям за их вклад в личностное и профессиональное развитие: д.б.н. Тихоновой М.А., д.б.н. Беличенко В.М., д.б.н. Калуюеву А.В., к.б.н. Федосеевой Л.А., Беляеву Н.Д. Автор благодарен своей семье за поддержку и помощь во всех начинаниях.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Болезнь Альцгеймера в свете современных представлений

Болезнь Альцгеймера – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся формированием внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, внеклеточных сенильных бляшек, гибелью нейронов, что ведет к прогрессирующей и неизлечимой деменции. Несмотря на то, что деменция может быть вызвана различными цереброваскулярными или нейродегенеративными заболеваниями, БА является самой частой причиной развития данного состояния [9]. Распространенность всех форм деменций во всем мире составила 667,2 случая, а в России - 1150 на 100 000 человек. Среди лиц старше 80 лет показатель распространенности среди женщин составил 20 244 случая на 100 000 человек по сравнению с 14 378 на 100 000 у мужчин. В настоящее время более 50 миллионов человек в мире страдают деменцией, при этом ежегодно регистрируется около 5 миллионов новых случаев заболевания [10]. Ожидается, что число людей с деменцией будет удваиваться каждые 20 лет и к 2050 году заболеваемость достигнет 115 миллионов человек [11]. Несмотря на то, что за последние 50 лет распространенность деменции увеличилась как в странах с высоким, так и в странах со средним/низким уровнем дохода, в связи с увеличением ожидаемой продолжительности жизни, в некоторых странах с высоким уровнем дохода, таких как США, Великобритания и Франция, заболеваемость деменцией несколько снизилась [12]. Более низкая заболеваемость деменцией у людей, родившихся в последние десятилетия, может быть связана с изменениями в образовании, социально-экономической сфере, здравоохранении, которые вели к повышению качества жизни. Следует понимать, что снижение заболеваемости деменцией не всегда напрямую связано с БА. Однако есть свидетельства снижения содержания А β в головном мозге на 24% при сравнении пациентов, умерших в возрасте 65 лет и старше, в период с 1972 по 2006 год. Это снижение было особенно заметно в самых старших возрастных группах. Т.е. у людей в возрасте 85 лет и старше, умерших в 2006 году было меньше отложений амилоида по сравнению с людьми в возрасте от 75 до 84 лет, умерших в 1972 году [13].

Совокупный показатель заболеваемости БА в возрасте 65 лет и старше в Европе составил 19,4 на 1000 человек [14]. Уровень заболеваемости БА увеличивается почти экспоненциально с увеличением возраста от 65 до 85 лет [15]. Однако остается неясным, продолжает ли заболевае-

мость увеличиваться даже в старческом возрасте или достигает плато. Это имеет важное значение для прогнозирования заболевания и понимания ее этиологии. Например, последовательное экспоненциальное увеличение заболеваемости с возрастом свидетельствует о том, что БА является неизбежным следствием старения, тогда как снижение заболеваемости, начиная с определенного возраста, может свидетельствовать о вмешательстве генетических факторов и/или факторов окружающей среды [16].

Практически во всем мире наблюдается сходная картина подтипов деменции: БА и сосудистая деменция, как две наиболее распространенные формы, на долю которых приходится от 50 % до 70 % и от 15 % до 25 %, соответственно, всех случаев деменции [17]. Однако по официальной статистике, в России зарегистрировано лишь 8800 пациентов с БА. По данным министерства здравоохранения Новосибирской области, на территории Новосибирской области, на 01.01.2020 заболеваемость по болезни Альцгеймера (G30) равна 4,1 на 100 000 населения. Заболеваемость по сосудистой деменции (F01) равна 164,1 на 100 000 населения. Несмотря на сильно заниженные официальные показатели заболеваемости БА ввиду различных причин, по данным руководителя отдела гериатрической психиатрии ФГБУ «Научный центр психического здоровья» РАН Светланы Гавриловой, количество пациентов БА может достигать 1,4 млн. человек.

Согласно Международной классификации болезней (МКБ-10, 1992) БА можно разделить на 2 клинических типа: 1) БА с ранним началом (синонимы: тип 2 болезни Альцгеймера, пресенильная деменция альцгеймеровского типа) развивается преимущественно в пресенильном возрасте; 2) БА с поздним началом (синонимы: тип 1 болезни Альцгеймера, сенильная деменция альцгеймеровского типа). Заболевание начинается в преобладающем большинстве случаев в старческом или (реже) пожилом возрасте. От 75 до 85% случаев сенильной деменции альцгеймеровского типа начинаются в возрасте 65-85 лет. Продолжительность заболевания колеблется от 4 до 15 и более лет. Кроме того, предусмотрено выделение атипичной БА или деменции смешанного типа, т. е. сочетания проявлений, характерных для БА и сосудистой деменции.

БА является многофакторным заболеванием, при котором пожилой возраст является самым сильным фактором риска, что позволяет предположить, что биологические процессы, связанные со старением, могут быть вовлечены в патогенез заболевания. Кроме того, сильная связь БА с возрастом может частично отражать кумулятивный эффект различных факторов риска и защиты на протяжении всей жизни, включая влияние сложных взаимодействий генетической предрасположенности, психосоциальных факторов, биологических факторов и воздействия окружающей среды на протяжении всей жизни. С основными факторами риска и протекции от БА можно ознакомиться в обзоре Армстронга [18].

Механизмы патогенеза. Классическая деменция при БА включает в себя формирование внеклеточных амилоидных бляшек, широко распространяющихся по всей коре головного мозга,

и тау-содержащих нейрофибриллярных клубков, которые первоначально возникают в медиальных отделах височной доли, а затем в неокортикальных областях височной, теменной и лобной долях [19]. Согласно амилоидной гипотезе, отложениям $A\beta$ в паренхиме головного мозга отводится центральная роль в патогенезе БА. Они инициируют последовательность событий, таких как формирование нейрофибриллярных клубков, клеточную гибель, сосудистые повреждения, приводящие в конечном итоге к деменции при БА.

Пептиды $A\beta$ образуются из трансмембранного белка предшественника $A\beta$ APP (Amyloid precursor protein). Белок-предшественник β -амилоида (APP) может расщепляться двумя путями: неамилоидогенным путем или амилоидогенным путем (Рис.1). В нормальных условиях большая часть APP расщепляется внутри домена $A\beta$ с помощью α -секретазы с образованием секретируемого APP ($sAPP$) α и связанного с мембраной $CTF\alpha$ (C83). C83 может быть дополнительно расщеплен γ -секретазой с образованием внеклеточного фрагмента p3 и внутриклеточного карбокси-концевого фрагмента (CTF) γ . В амилоидогенном пути APP сначала расщепляется β -секретазой с образованием $sAPP\beta$ и связанного с мембраной βCTF (C99). Расщепление C99 γ -секретазой высвобождает $A\beta$ и внутриклеточный $CTF\gamma$. γ -секретаза расщепляет APP в нескольких местах вблизи внутреннего слоя плазматической мембраны с образованием вариантов пептида $A\beta$ различной длины.

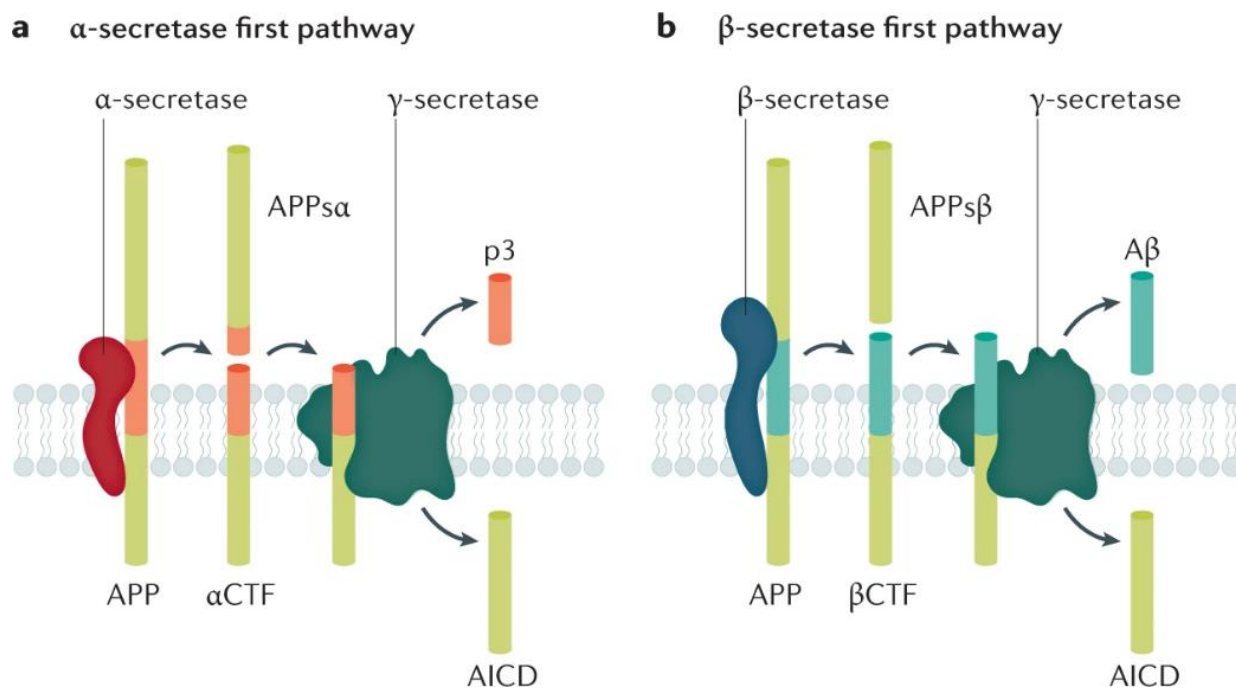


Рисунок 1. Пути расщепления белка предшественника амилоида APP по Кнорман D. S. et al, 2021 [20]. А - неамилоидогенный путь расщепления APP посредством α -секретазы. В - амилоидогенный путь расщепления APP посредством β -секретазы.

A β присутствует в крови и в мозге всех людей на протяжении всей жизни [21]. В мозге астроциты и нейроны способны синтезировать APP, но только нейроны имеют ферменты, которые могут расщеплять его до A β . Непрерывный и массивный двунаправленный трафик A β через гематоэнцефалический барьер с использованием рецепторов, которые демонстрируют высокое сродство к A β и высокую скорость транспорта с существенными метаболическими затратами вряд ли существовал бы просто, как путь выведения нейротоксических отходов катаболизма APP.

A β в пикомолярных концентрациях повышает синаптическую пластичность, обучаемость и память у животных, способствуя долговременной потенциации (LTP) в гиппокампе. Его действие включает увеличение высвобождения нейротрансмиттера ацетилхолина и активацию никотиновых рецепторов ацетилхолина [22, 23]. Важно отметить, что длительное воздействие A β на рецепторы связано с толерантностью и приводит к уменьшению эффектов A β . Известны противоречивые данные как об ингибировании [24], так и о потенцировании LTP [25, 26]. Анализ таких данных осложняется еще тем, что LTP ингибируется олигомерами A β , но не мономерами [27]. A β также облегчает нейрональную деполяризацию, усиливая вход кальция на пресинаптической мембране через активацию никотиновых ацетилхолиновых рецепторов [28].

Электрическая и химическая стимуляция глутаматергических нейронов увеличивает продукцию и высвобождение A β [29]. В микромолярных концентрациях A β снижает синаптическую активность глутаматергических нейронов, но увеличивает активность астроцитов в клиренсе глутамата в синаптической щели [29]. Возможно, высвобождение A β активированными нейронами может стимулировать астроциты к выведению глутамата из синаптической щели, тем самым, снижая потенциал для дальнейшей нейрональной активации.

A β обладает нейротрофической активностью *in vitro* [30]. Наномолярные концентрации A β 1-40 в первичной нейрональной культуре клеток увеличивают концентрации мембранных фосфолипидов, экспрессию APP, тау белка, GAP-43 белка, каждый из которых ассоциирован с ростом аксонов [31]. Прорастание аксонов также было отмечено на трансгенной линии мышей APP23, в которой депозиты A β формируются в результате «шведской» мутации гена APP [32]. Если предотвратить продукцию A β через ингибирование β и γ -секретаз, выживаемость первичных нейронов коры в культуре снижается на 20-50 % по сравнению с контролем. Ее можно восстановить, добавив A β в пикомолярных концентрациях [33]. Предшествующие результаты на клеточных и животных моделях показывают, что A β способствует росту аксонов и что присутствие A β увеличивает выживаемость нейронов в различных условиях. Таким образом, стратегии, направленные на снижение количества биодоступного A β , могут повлиять на жизнеспособность и пластичность нейронов в головном мозге.

В низких наномолярных концентрациях A β 1–40 ингибирует аутоокисление липопротеинов плазмы и ликвора [34]. A β 1–40 и A β 1–42 снижают медь-индуцированное окисление липопротеинов низкой плотности. A β 1–40 уменьшал количество погибших нейронов в культуре, после воздействия токсичных количеств железа или меди [35]. Это было подтверждено *in vivo* на крысах в коре. Инъекция человеческого A β 1–42 снижало нейротоксичность как меди, так и железа [36]. Антиоксидантная роль A β согласуется с *post-mortem* наблюдениями пациентов с БА. Маркеры нейронального окисления обратно коррелируют с частотой амилоидных бляшек [37]. Степень резистентности липопротеинов к окислению в ликворе коррелирует с количеством A β 1–40 и A β 1–42 в ликворе [38].

В сенильных бляшках обнаружена высокая концентрация металлов и других потенциальных нейротоксинов. Вероятно, A β способен связывать и удалять такие соединения из внеклеточной жидкости головного мозга, выполняя роль биофлокулянта [39]. Таким образом, бляшки могут указывать на участки, где A β успешно перехватывает потенциально повреждающий агент. В этом контексте следует отметить, что относительно высокая плотность бляшек часто обнаруживается в мозге у пожилых людей без когнитивных нарушений [40].

В конечном счете, A β вызывает гибель клеток, и было высказано предположение, что его нейротоксические свойства зависят от состояния его сборки, при этом все больший интерес вызывают диффундирующие лиганды БА (ADDLs) [41]. ADDLs представляют собой подмножество нейротоксических растворимых нефибриллярных олигомеров A β . Олигомеры A β вызывают различные типы синаптических дефектов, такие как изменение захвата/высвобождения нейромедиаторов, аномалии цитоскелета, изменения локализации рецепторов в клетках и нарушение синаптической пластичности (ингибирование долговременной потенциации, LTP или активацию долговременной депрессии, LTD). Такие эффекты могли бы быть причиной дефицита памяти, хотя они никогда не были доказаны у пациентов с БА [42]. Было показано, что ADDLs взаимодействуют с различными мишенями, от α 7-никотиновых рецепторов до клеточного прионного белка [43], запуская таким образом несколько взаимодействующих механизмов (нарушение регуляции гомеостаза Ca²⁺, повреждение митохондрий, окислительный стресс, изменение аксонального транспорта, глиальную активацию и др.), ответственных за синапто- и нейротоксические эффекты [44]. Гипотеза амилоидного каскада получила дополнительное подтверждение в результате создания различных моделей трансгенных мышей APP или APP/PS1, которые, как было показано, воспроизводят некоторые из основных анатомо-патологических и поведенческих особенностей семейной формы БА, таких как образование амилоидных бляшек, потеря синапсов, изменения синаптической пластичности и ухудшение памяти [45]. Более того, различные фармакологические, генетические и иммунологические подходы, направленные на снижение церебральной

нагрузки Аβ у мышей с БА, приводили к уменьшению потери синапсов и восстановлению памяти [46].

1.2. Современные подходы к лечению болезни Альцгеймера

Многочисленные подтверждения гипотезы амилоидного каскада убедили научное сообщество в разработке лекарственных препаратов, направленных на снижение уровня Аβ. К сожалению, все препараты, влияющие на продукцию, клиренс и агрегацию Аβ, оказались клинически неэффективными. Интересно, что некоторые из этих препаратов, особенно ингибиторы двух ферментов, ответственных за продукцию Аβ из APP (γ-секретаза и β-секретаза), ухудшают когнитивные, психические и клинические состояния пациентов с БА [47]. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило всего 4 препарата к использованию в лечении когнитивных нарушений при БА. Три из них являются ингибиторами ацетилхолинэстеразы (Донепезил, Галантамин, Ривастигмин) и один из них – антагонистом NMDA рецепторов (Мемантин). В целом, клинические испытания данных препаратов демонстрируют коррекцию когнитивных нарушений [48]. Однако эффективность этих препаратов ограничена, поскольку они могут вызывать неблагоприятные побочные эффекты и не способны полностью остановить прогрессирование заболевания [49]. В июне 2021 года, впервые с 2003 года FDA одобрило новый препарат в лечении БА – Адуканумаб. Это моноклональное антитело против белка Аβ. Несмотря на его эффективность в отношении снижения уровня Аβ в головном мозге, клиническая эффективность в виде улучшения когнитивного профиля остается весьма сомнительной [50]. Таким образом, поиск новых терапевтических подходов остается востребованным.

Репозиционирование лекарств — это процесс установления новых видов применения лекарств, выходящих за рамки первоначальных медицинских показаний. Предпосылки репозиционирования заключаются в том, что препараты, ранее прошедшие клинические испытания, будут с минимальным риском подвержены неудачам в будущих клинических испытаниях на поздних стадиях из-за токсичности, что будет способствовать более быстрому одобрению лекарств [51]. В последнее время значение репозиционирования возрастает и становится основным в области исследования лекарственных средств. Эта стратегия оказалась достаточно эффективным подхо-

дом и в психофармакологии. Настоящее исследование было сосредоточено на индукторах аутофагии рапамицине и трегалозе и противомикробном препарате с нейропротекторными свойствами – цефтриаксоне.

Рапамицин – высокоспецифичный аллостерический частичный ингибитор mTORC1, который используется как иммуносупрессант при трансплантации органов [52]. mTORC1 играет центральную роль в поддержании гомеостаза и его нарушении при старении. Имеются данные о том, что рапамицин, ингибируя активность mTOR, влияет на продолжительность жизни и течение возрастных заболеваний, снижает биосинтез белка, а также способствует активации аутофагии [53]. На трансгенной модели гиперэкспрессии белка предшественника A β у мышей длительное лечение рапамицином снижало уровень патогенного белка и восстанавливало когнитивные реакции запоминания и обучения [54], при этом рапамицин индуцировал аутофагию, прежде всего, в гиппокампе. На модели БА у мышей линии 3xTg рапамицин в низких дозах (1 мг/кг, перорально, ежедневно в течение 2 месяцев) повышал экспрессию маркера аутофагии белка LC3-II, снижал уровень A β 1-42 (растворимого и нерастворимого), улучшал пространственную память мышей в тесте водного лабиринта Морриса [55]. Встречаются и негативные результаты активации аутофагии рапамицином. Так, отмечено, что в культуре клеток рапамицин может усиливать накопление A β , предотвращаемое ингибированием аутофагии 3-метиладенином [56]. Вероятно, это связано со снижением слияния аутофагосом с лизосомами в нейронах на поздних стадиях БА [57]. Соответственно, терапевтическое вмешательство должно быть направлено на повышение активности лизосом и везикулярного слияния, а не только аутофагии как таковой.

Трегалоза – дисахарид, образованный α -1,1-гликозидной связью между двумя молекулами α -глюкозы. Спектр использования трегалозы в медицине довольно широкий: от криоконсервации клеток и органов до лечения синдрома «сухого глаза» в офтальмологии [58]. Относительно нейропротекторного действия трегалозы показано, что она может снижать цитозольную концентрацию агрегатов потенциально опасных белков, включая хантингтин, α -синуклеин, фосфорилированный тау. В культуре клеток она снижала секрецию A β , тормозила деградацию APP и его C-концевого фрагмента в эндолизосомном компартменте [59]. Одновременно трегалоза вызывала выраженное накопление маркеров аутофагии белков LC3-II и p62. У APP/PS1-трансгенных мышей трегалоза, введенная в желудочки мозга, восстанавливала когнитивную активность и способность мышей к обучению, снижала накопление A β в гиппокампе [60]. На трансгенных мышях rTg4510 и Jnl3 с гиперэкспрессией тау трегалоза стимулировала экспрессию маркеров аутофагии, снижала агрегацию тау и улучшала моторные и когнитивные функции [61]. В мышечной модели преждевременного старения, вызванного D-галактозой, трегалоза значительно восстанавливала ухудшение обучения и памяти и улучшала способность исследовать новые предметы [62]. Кроме того, трегалоза способна предотвращать агрегацию тау *in vitro* [63], поддерживая нативное

состояние белков. Эти пути считаются основными механизмами терапевтического действия трегалозы.

В целом, модуляция аутофагии существенно влияет на течение БА, а данный терапевтический подход уже используется в клинических испытаниях [64]. Однако для изучения терапевтического действия, рапамицин и трегалоза использовались совместно только на культуре клеток. В данном исследовании такая комбинация в отношении анимальной модели БА применяется впервые.

Цефтриаксон (Цеф) – цефалоспориновый антибиотик III поколения. Он хорошо растворяется в воде и проникает через гематоэнцефалический барьер [65]. Патологическое накопление глутамата, основного возбуждающего нейротрансмиттера, в синапсах приводит к эксайтотоксической гибели нейронов при ряде неврологических заболеваний. Глутамат выводится из синаптической щели в основном с помощью глутаматного транспортера-1 (GLT-1), активность которого, Цеф способен увеличивать в астроцитах [66]. В результате последующей нормализации уровня глутамата, Цеф стал рассматриваться как антиэксайтотоксический препарат и использоваться на моделях нейродегенеративных заболеваний, связанных с повышением уровня глутамата [67, 68]. Положительный эффект Цеф был продемонстрирован в отношении двигательных дефицитов у крыс в экспериментальной модели болезни Паркинсона [69]. Препарат активно изучается в доклинических исследованиях на моделях неврологических расстройств у животных [70, 71]. Появились данные клинических испытаний Цеф в качестве нейропротекторного средства при боковом амиотрофическом склерозе или деменции при болезни Паркинсона [72].

Поскольку БА сопровождается эксайтотоксичностью, эффекты Цеф были также исследованы на моделях БА. Длительное введение Цеф в дозе 200 мг/кг на трансгенной модели 3xTg вызвало значительное увеличение экспрессии GLT-1, снизило патологическое накопление тау, восстановило экспрессию синаптических белков и когнитивные функции, но оказало минимальное воздействие на патологию А β [73]. На крысах линии OXYS, модели преждевременного старения и спорадической формы БА длительное введение Цеф в дозе 100 мг/кг увеличило экспрессию генов *Mme*, *Ide*, участвующих в деградации А β во фронтальной коре, снизило экспрессию генов *Vac1*, *Ace2* в гипоталамусе [74]. Эти результаты выявили новые мишени Цеф, которые могут быть вовлечены в нейропротективные механизмы на ранних стадиях развития БА-подобной патологии на животных. Учитывая неопределенность во взаимодействии Цеф и амилоидной патологии, а также открытие новых мишеней Цеф, связанных с метаболизмом А β , одной из задач данного исследования стало исследование терапевтического потенциала Цеф на фармакологической модели БА с введением олигомеров А β в боковые желудочки головного мозга.

1.3. Нарушения памяти и обучения при нейродегенерации

Нейродегенерация - процесс, который характеризуется необратимым повреждением и гибелью нейронов. Он присутствует как при физиологическом старении, так и при патологических нейродегенеративных заболеваниях. Нейродегенерация неминуемо ведет к функциональным проявлениям нейронального дефицита – к нарушениям когнитивных функций.

Потеря кратковременной памяти (на примере свободного припоминания списка слов или рассказов [75, 76] с относительным сохранением немедленной [77] и долговременной памяти [78]) сообщалось у здоровых пожилых людей уже на шестом десятилетии. Снижение памяти в начале БА, в отличие от того, что происходит при нормальном старении, представляет собой постоянное и прогрессирующее изменение прежних способностей человека и часто приводит к легким нарушениям повседневных функций [79]. С другой стороны, «доброкачественная» забывчивость здорового старения обычно бывает легкой, непостоянной и не связана с нарушением повседневной БА, нормальное старение связано с расстройством типа дефицита памяти, при котором пациент отвечает правильно на вопросы с подсказками и вопросы с несколькими вариантами ответов [80]. Принято считать, что при здоровом старении могут происходить существенные когнитивные изменения. Однако некоторые из предыдущих исследований, связывающих когнитивные изменения с возрастом, могли быть непреднамеренно контаминированы людьми с невыявленной слабосимптомной или предсимптомной деменцией [81]. Многолетние исследования здоровых пожилых людей, которые были тщательно обследованы во избежание включения лиц с предсимптомной патологией, обычно демонстрируют стабильные когнитивные показатели вплоть до девятого десятилетия жизни [81, 82]. Основное клиническое различие между когнитивными изменениями при старении и изменениями, лежащими в основе деменции, заключается в том, что при отсутствии основной патологии, когнитивные изменения при старении являются «доброкачественными» и относительно статичными, тогда как при деменции они прогрессируют и связаны с функциональными нарушениями. Здоровые пожилые люди сохраняют способность использовать компенсаторные стратегии (например, ведение списков и календарей) и способны к обучению и навыкам адаптации, которым потенциально способствуют их стабильная когнитивная деятельность с течением времени.

Деменция, в свою очередь, характеризуется снижением по сравнению с ранее установленным уровнем когнитивных и функциональных возможностей человека, достаточным для нарушения повседневной деятельности. Значительное ухудшение кратковременной памяти с неспособностью удерживать новую информацию является типичным клиническим признаком у большинства людей с БА. Характерные признаки нарушения кратковременной памяти включают в

себя повторение вопросов или утверждений, частую потерю предметов и трудности с запоминанием имен знакомых людей. Рабочая память, долговременная декларативная память и имплицитная память страдают в гораздо меньшей степени, чем кратковременная декларативная память при БА. Люди с ранней БА испытывают трудности с исполнительными функциями, такими как планирование и организационные навыки, умение рассуждать и решать проблемы, а также решать сложные задачи. Более сложные домашние дела или финансовые операции могут выполняться плохо или только с посторонней помощью. Могут быть признаки легкой временной или пространственной дезориентации, в том числе легкие трудности с временными отношениями или потребность в дополнительной помощи для прибытия в пункт назначения.

Умеренная и тяжелая стадии БА. Эти стадии характеризуются прогрессирующим снижением когнитивных функций, что приводит к более серьезным функциональным нарушениям и полной неспособности к контролю за базовыми жизненными функциями. Снижается скорость умственной обработки и способность переключаться между различными задачами (когнитивная гибкость). Постепенно нарушаются основные типы эксплицитной долговременной памяти: семантическая [83], эпизодическая [84]. Возникают проблемы с запоминанием событий, имен, изучением нового, планированием сложных мероприятий, таких как ужин. По сравнению со здоровыми пожилыми людьми у пациентов с БА, по-видимому, наблюдается ухудшение выполнения концептуальных, но не перцептивных задач имплицитной памяти [85].

Что касается моделей на животных, существует множество парадигм для проверки функций памяти и обучения, аналогичные функциям памяти и обучения человека. Для оценки функции рабочей памяти у животных часто используются задачи с задержкой, например, задача с отложенным чередованием (delayed alternation), тест на отложенный выбор по несоответствию расположения (Operant delayed-non-matching-to-position task). Основой этих задач является то, что информация о предыдущем испытании должна быть временно сохранена «онлайн» в течение промежуточного периода, когда стимул отсутствует, а затем доступ к ней возможен в течение периода ответа. Более длительные задержки увеличивают сложность испытания и могут привести к снижению точности выполнения. У грызунов задача с отложенным чередованием чаще проводится в Т-образный лабиринте, в котором мышь или крыса должна выбрать альтернативный, в сравнении с предыдущим испытанием, рукав, чтобы получить пищевое вознаграждение. В этом задании используется присущая грызунам склонность чередовать выбор рук при последовательных испытаниях [86]. Эта задача широко используется для изучения рабочей памяти. Ее выполнение особенно чувствительно к повреждению гиппокампа у грызунов [87].

Внимание, исполнительная функция и когнитивная гибкость – эти три когнитивных навыка представляют собой функции более высокого порядка, которые сильно зависят друг от

друга, поэтому их трудно протестировать по отдельности. Для оценки этих навыков у грызунов можно использовать задачи переучивания [88].

Декларативная эпизодическая память измеряется у грызунов с помощью задач пространственного обучения, за которыми следуют пробные испытания. В первой фазе теста, в задаче пространственного обучения, животное должно запомнить местоположение (например, связанное с вознаграждением); затем пробные испытания служат для оценки сохранения памяти животного (например, из какого места было удалено вознаграждение). На грызунах эти тесты можно проводить в водном лабиринте Морриса или в *Intelliscage* (задачи предпочтения или избегания). Память о страхе у животных предлагает надежную модель тестирования имплицитного обучения, и, что важно, модель, в которой мы уже хорошо понимаем основные нейронные связи [89]. Тест пассивного избегания относится к оперантному типу обучения. Он использует положительное наказание, как оперантное обстоятельство обучения. При положительном наказании применение аверсивного безусловного стимула приводит к снижению проявления данного поведения.

Для некоторых из обсуждаемых парадигм есть доказательства сильной трансляционной значимости от крысы к человеку (например, задачи на внимание, рабочую память и др.). Для других парадигм трансляционная значимость может быть сильна ограничена одним видом (например, речевые функции). Несмотря на то, что многие поведенческие тесты и экспериментальные процедуры нуждаются в значительной доработке для повышения достоверности и надежности трансляционных исследований когнитивных функций, они остаются важным инструментом для понимания нейродегенеративных заболеваний и разработки новых фармакологических препаратов.

1.4. Роль аутофагии при нейродегенерации

Аутофагия представляет собой путь внутриклеточной деградации, необходимый для клеточного и энергетического гомеостаза. Он участвует в очистке частично денатурировавших белков и поврежденных органелл, а также в переработке цитозольных компонентов во время голодания, чтобы компенсировать недостаток питательных веществ [90]. Этот процесс регулируется mTOR (mammalian target of rapamycin)-зависимым и mTOR-независимым путями, которые поддаются химическим воздействиям [91]. Было идентифицировано несколько небольших молекул, модулирующих аутофагию, которые могут иметь потенциальное терапевтическое применение

при различных заболеваниях человека, включая нейродегенерацию [91]. Склонные к агрегации белки, ассоциированные с нейродегенерацией, преимущественно деградируют за счет аутофагии, и поэтому стимуляция этого процесса с помощью химических индукторов позволяет исследовать механизмы взаимодействия аутофагии и нейродегенеративных заболеваний. Появляющиеся данные указывают на то, что скомпрометированная аутофагия вносит вклад в возникновение и развитие различных нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушениями конформации белков, вызывая накопление белков и клеточную токсичность.

Динамический процесс аутофагии включает в себя генерацию аутофагосом и их слияние с поздними эндосомами с образованием амфисом, которые впоследствии сливаются с лизосомами, образуя аутолизосомы для деградации своего содержимого (Рис. 2). Этот процесс инициируется образованием изолированных мембран в цитоплазме, называемых фагофорами. Мембранный источник фагофоров, возможно, возникает из эндоплазматического ретикулума (ЭПР), плазматической мембраны, митохондрий и мест контакта ЭПР с митохондриями [92]. Фагофоры поглощают цитоплазматическое содержимое во время своего удлинения, образуя двухмембранные пузырьки, называемые аутофагосомами. Аутофагосомы сливаются с поздними эндосомами, образуя связанные с одной мембраной гибридные органеллы, называемые амфисомами, которые, вероятно, действуют как стоки для аутофагического и эндоцитарного путей [93]. Затем амфисомы сливаются с лизосомами с образованием кислых аутолизосом, в которых происходит расщепление содержимого.

Аутофагия – эволюционно древний процесс, обнаруженный еще у дрожжей, в котором несколько связанных с аутофагией (Atg) белков управляют стадиями инициации, удлинения, созревания и слияния путей реализации процесса [94]. Одним из таких белков является ассоциированный с микротрубочками белок 1A/1B, легкая цепь 3B (LC3) (гомолог дрожжевого Atg8 у млекопитающих). LC3 подвергается посттрансляционному расщеплению С-конца протеазой Atg4B, в результате чего образуется цитозольная форма LC3-I, которая затем конъюгируется с PE (фосфатидилэтаноламином) в реакции с участием Atg7 и Atg3 с образованием ассоциированной с аутофагосомами формы LC3-II [95]. LC3-II опосредует связывание и слияние мембран, необходимое для расширения и закрытия фагофоров с образованием аутофагосом, где он остается связанным на протяжении всей их жизни [96]. Таким образом, уровни LC3-II коррелируют с устойчивым числом аутофагосом [97]. Молекулы LC3-II, находящиеся на внутренней мембране аутофагосом, деградируют внутри аутолизосом, тогда как LC3-II на цитоплазматической поверхности аутолизосом делипидируется с помощью Atg4 и может использоваться повторно [98]. Между двумя системами конъюгации возникают перекрестные помехи. Например, комплекс Atg12–Atg5·Atg16L1 действует как убиквитинлигаза E3, облегчая конъюгацию LC3-I – PE.

Накопление аутофагосом наблюдается в биоптатах мозга пациентов с БА, клеточных линиях или мышечных моделях БА, что может представлять собой как активацию аутофагической активности, так и дефицит слияния аутофагосом с лизосомами [99]. Неэффективная аутофагическая деградация пептида А β приводит к внутриклеточному накоплению агрегатов пептида, которые могут быть токсичными для нейронов. С другой стороны, эти исследования указывают на цитопротекторную роль аутофагии в деградации пептидов А β .

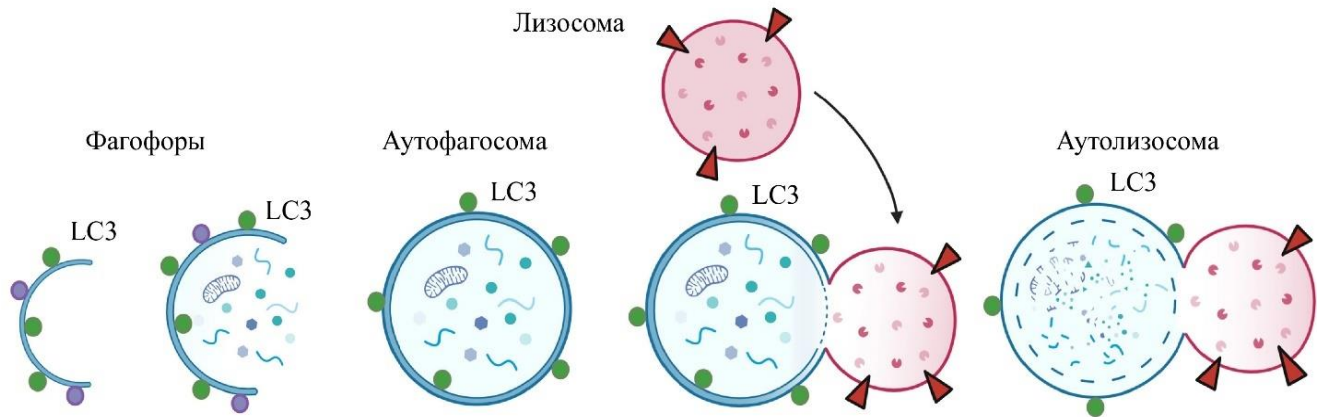


Рисунок 2. Схема образования аутолизосом из фагофоров по Fleming and Rubinsztein, 2020 в модификации [100].

Известно, что белок Beclin 1 (BECN1) (его кодирующий ген *Becn1*) является важной частью мультибелкового комплекса, необходимого для образования аутофагического пузырька. При этом считается, что аутофагия имеет связь с регуляцией нейровоспаления. Так, снижение BECN1 и последующее нарушение аутофагии приводит к усиленному высвобождению IL-1 β и IL-18 из микроглии. Микроглия, полученная от пациентов с БА экспрессировала сильно сниженный уровень белка BECN1 [101]. На трансгенной модели Tg2576 на мышах были получены данные о снижении уровней мРНК гена *Becn1* в 2,8 раза в коре головного мозга у 12-месячных мутантных особей, по сравнению с животными дикого типа [102].

Помимо канонических признаков БА в виде сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков, эта нейропатология включает митохондриальную дисфункцию и изменения процессов митофагии, молекулярные дефекты и механизмы которых еще только выясняются [103]. Отмечается, что при БА высокие уровни А β и тау-белка ингибируют экспрессию основных белков митофагии: PINK1 (PTEN-индуцированная киназа 1, участвующая в определении степени повреждения митохондрий) и паркина (E3-убиквитинлигаза, ее кодирующий ген *Park2*), тем самым уменьшая количество аутофагосом [104]. В процессе паркин-зависимой митофагии PINK1 функционирует как датчик повреждения митохондрий, паркин — как усилитель сигнала, а цепи убиквитина — как сигнальный эффектор [105]. Сигнальный путь паркина значительно активируется

при прогрессирующем накоплении Аβ и повреждениях митохондрий, как в мозге пациентов, так и на моделях БА у животных. При БА и по мере прогрессирования заболевания содержание цитозольного паркина истощается в головном мозге, что приводит к нарушению митофагии и увеличению митохондриальной патологии [106]. Этот белок накапливается там, где он больше всего связан с патологией БА - гиппокампе. Уровень паркина является потенциальным индикатором митохондриального повреждения. При митохондриальном стрессе, активирующем систему противовоспалительной защиты, митохондрии высвобождают различные виды кислородных радикалов, вызывая порочный круг, заканчивающийся дисфункцией митохондрий. Определенное количество этих реактивных факторов будет приводить к высвобождению апоптотических факторов (цитохром-С) и последующему клеточному апоптозу. Ключевой защитой нейрона в этом состоянии является митофагия, которая отвечает за удаление дисфункциональных митохондрий до того, как нейрон погибнет в результате апоптоза. Митохондриальные нарушения и деполяризация наружной митохондриальной мембраны, вызванные Аβ и тау белком, увеличивают белковую экспрессию паркина и его транслокацию, тогда как сами Аβ и тау препятствуют транслокации паркина и снижают его уровень [107]. На генетической APP/PS1 модели БА на мышах, в большинстве молекулярных исследований паркина в мозге упоминается, что его уровни были значительно выше у мышей с БА, по сравнению со здоровым контролем [107]. Однако на фармакологической модели крыс Wistar было обнаружено снижение экспрессии белков аутофагии: паркина, PINK1 и беклина в гиппокампе через месяц после интрацеребрального введения Аβ1-42 [108].

Пути активации аутофагии. Стимуляция mTOR-зависимого сигнального пути уменьшает накопление амилоида и устраняет поведенческие нарушения в моделях БА на животных [109]. Терапевтические эффекты mTOR-независимой индукции аутофагии в моделях БА также значительны. Активация mTOR-независимого пути карбамазепином улучшает функции памяти, за счет увеличения потока аутофагосом и уменьшения количества амилоидных бляшек и Аβ1-42 [110]. Нарушение аутофагии, включая снижение митофагии, вносит значительный вклад в развитие нейродегенерации [111]. Нарушения аутофагии при БА появляются задолго до появления нерастворимых белковых включений (Аβ-содержащие сенильные бляшки или фосфорилированные тау-содержащие нейрофибриллярные клубки) [6]. Дисфункция аутофагии часто связана с нарушением потоков аутофагосом и лизосом. Лизосомальный поток снижен при БА, а накапливающиеся аутофагосомы плохо удаляются из-за уменьшения слияния аутофагосом с лизосомами; последнее явление связано с нарушением закисления лизосом [112]. В связи с этим предпринимаются попытки сочетать терапевтическую активацию аутофагии с усилением лизосомального потока [113]. Кроме того, плейотропное снижение активности mTOR сопровождается ингибированием биосинтеза, трансляции, клеточного роста, пролиферации и иммунитета [114]. До сих пор неясно, необходимы ли эти клеточные процессы для усиления ответа аутофагии через

mTOR-независимый регуляторный путь [91]. Практически важно определить, в какой степени эти два сигнальных пути стимуляции аутофагии (через различные регуляторные мишени) модулируют аутофагический ответ, включая сбалансированные и достаточные потоки аутофагосом и лизосом. Примечательно, что mTOR-независимый индуктор аутофагии, трегалоза способна активировать лизосомальный поток, воздействуя на «главный регулятор» биогенеза лизосом: белок TFEB [115]. Более того, активация аутофагии трегалозой может ингибировать окислительный стресс, благодаря стимуляции митофагии и эндогенных антиоксидантных ресурсов (таких как сигнальный путь KEAP1-NRF2 и др.) [116]. Кроме того, трегалоза обладает свойством шаперона, а именно предотвращает аномальные, склонные к агрегации пространственные конформации белков [117].

Аутофагия имеет решающее значение как для физиологического старения нейронов, так и в течение нейродегенеративных заболеваний. Нарушение функции нейрональной аутофагии является одним из ключевых факторов, влияющих на развитие нейродегенеративных заболеваний, в том числе БА. Аутофагия играет одну из ключевых ролей в метаболизме A β и тау-белка, пути mTOR, нейровоспалении. Соответственно, терапевтические подходы, направленные на активацию аутофагии, могут привести к разработке новых терапевтических стратегий для лечения БА.

1.5. Вклад нейровоспаления в развитие нейродегенерации

Все больше данных свидетельствует о том, что развитие нейродегенерации не ограничивается повреждением и гибелью нейронного аппарата, а включает сильные взаимодействия с иммунологическими механизмами в головном мозге [118]. Неправильно свернутые и агрегированные белки связываются с рецепторами распознавания образов (Pattern recognition receptors) на микроглии и астроглии и запускают механизмы врожденного иммунного ответа, характеризующиеся высвобождением медиаторов воспаления, которые способствуют прогрессированию и тяжести заболевания [119].

Пролиферация и активация микроглии в головном мозге, сконцентрированная вокруг амилоидных бляшек, является характерным признаком БА [120]. Появляется все больше свидетельств того, что микроглия препятствует развитию БА, поскольку нарушение активности микроглии и измененный ответ микроглии на A β связаны с повышенным риском БА. С другой стороны, есть также многочисленные свидетельства того, что активированная микроглия может

быть вредной для нейронов. Микроглия может опосредовать потерю синапсов за счет поглощения, вероятно, через комплемент-зависимый механизм. Она также может усугублять патологию тау и секретировать воспалительные факторы, которые могут повреждать нейроны напрямую или через активацию нейротоксических астроцитов [121]. Классическим маркером микроглии является адаптерная молекула 1, связывающая ионизированный кальций (IBA1), которая представляет собой белок, кодируемый геном *Aif-1* (Allograft inflammatory factor). Результаты исследований по измерению IBA1 в тканях головного мозга людей относительно неоднородны. В целом, несоответствие между исследованиями, использующими анализы на основе экспрессии, и теми, в которых использовался подсчет клеток, свидетельствует о том, что экспрессия IBA1 и, следовательно, активация микроглии увеличивается при БА, не влияя на абсолютное количество микроглии [122].

Гликопротеин Липокалин 2 (LCN2, его кодирующий ген *Lcn2*) - это белок острой фазы воспалительной реакции млекопитающих, участвующий в гомеостазе железа. Известно, что он вовлекается в механизмы патогенеза БА, его участие прослеживается в процессах контроля над нейровоспалением, инсулиновой сигнализацией, созревaniem нейритов. LCN2 в высокой степени вырабатывается эпителиальными клетками хориоидного плексуса и астроцитами (но не микроглией или нейронами) в ответ на увеличение содержания $A\beta_{1-42}$ в тканях структур мозга [123]. Согласно исследованиям *in vitro* LCN2 участвует в клеточных механизмах $A\beta_{42}$ -индуцированного нейровоспаления и проапоптотического сигнального пути [124]. На мышинной модели БА J20 LCN2 влиял на дисрегуляцию железа, но не на когнитивные функции и накопление $A\beta$ в бляшках [125]. Используя модели хронических метаболических заболеваний *in vivo*, таких как ожирение или рак, LCN2 был связан с нейротоксичностью гиппокампа и когнитивными нарушениями посредством нейровоспаления, окислительного стресса и утечки через гематоэнцефалический барьер [126]. В отличие от исследований, показывающих вредное воздействие LCN2, в некоторых исследованиях сообщается, что LCN2 поддерживает нормальную функцию памяти и защищает мозг от воспаления [127]. В результате LCN2 выполняет различные функции в качестве нейропротекторного или нейротоксического агента. В исследованиях на людях экспрессия LCN2 была усилена в мозге пациентов с БА *post-mortem*, особенно в гиппокампе [124]. В ликворе же было обнаружено снижение LCN2 у пациентов с умеренными когнитивными расстройствами и БА [128]. Однако, поскольку LCN2 изменяется в зависимости от возраста, пола, ожирения и многочисленных метаболических переменных, результаты LCN2 в сыворотке или спинномозговой жидкости неоднозначны в отношении нарушений памяти.

Известно, что воспалительный процесс, вызванный токсическим действием олигомерных форм $A\beta$, сопровождается усилением оксидативного стресса и увеличением производства кисло-

родных радикалов. Индукция окислительного стресса происходит, как за счет образования радикалов, возникающих при взаимодействии Аβ с ионами металлов (медь, железо), так и за счет нейротоксического действия олигомерных форм Аβ [129]. Однако то, как олигомерные формы Аβ запускают окислительный стресс, в настоящее время остается неясным. Одним из наиболее важных механизмов защиты от окислительного стресса является система NRF2. В физиологических условиях NRF2 регулируется его цитоплазматическим ингибитором KEAP1 (Kelch Like ECH Associated Protein 1). При активации NRF2 перемещается из цитозоля в ядро, где он связывается с элементами антиоксидантного ответа (ARE, antioxidant response elements), вызывая экспрессию антиоксидантных и метаболических генов [130]. Ядерный фактор NRF2 (Nuclear factor erythroid 2- (NF-E2-) related factor 2) является ключевым регулятором антиоксидантной и противовоспалительной реакции. Недавние литературные данные показывают наличие связи между белком NRF2 (его кодирующий ген *Nrf2*) и снижением когнитивных функций, связанных с БА, хотя механизм ее остается до сих пор неизвестным [131]. Ядерный белок NRF2 действует как активатор транскрипции, который связывается в ядре с сайтом ARE в промоторе целевого гена и увеличивает его экспрессию. Например, NRF2 участвует в регуляции экспрессии генов аутофагии [132], подавляет экспрессию генов BACE1 и BACE1-AS посредством связывания с элементами антиоксидантного ответа (ARE) в их промоторах у мыши и человека [133], ингибирует опосредованную NF-κB транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, включая IL-6 и IL-1β [134]. Направленность изменения экспрессии мРНК гена *Nrf2* в структурах мозга при развитии патологии БА и возрастных изменениях носит противоречивый характер. На 3хТg модели БА у мышей были выявлены двухфазные возрастные изменения активности *Nrf2*. В возрасте 2–3 месяца активность *Nrf2* у этих мышей была повышена по сравнению с контролем, но затем она быстро снижалась с возрастом. Снижение экспрессии мРНК мишеней NRF2 проявлялась в гомогенатах лобной коры трансгенных мышей APP/PS1 шестимесячного возраста, что совпадало с появлением амилоидной патологии. При этом в другой работе в гиппокампе тех же мышей с моделью БА в том же возрасте было обнаружено, что NRF2 и его мишени либо не изменились, либо увеличились [135]. Данные о снижении уровней мРНК гена *Nrf2* в 3,1 раза в коре головного мозга 12-мес мутантных мышей, по сравнению с диким типом, были получены на анимальной трансгенной модели Tg2576 [102]. У человека при БА в нейронах гиппокампа NRF2 был преимущественно цитоплазматическим, т.к. происходило его снижение в ядрах клеток. Причем снижение NRF2 при БА наблюдалось и в ядрах нейронов фронтальной коры. Это свидетельствовало о том, что при БА какой-то процесс блокирует ядерную активность NRF2, потенциально способствуя дисфункции и/или потере нейронов [136].

Молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), также известная как CD54 (кластер дифференцировки 54) является основным лигандом для антигена 1, ассоциированного с лимфоцитарной функцией (LFA-1, CD11a), представляет собой белок, который у человека кодируется геном *ICAM1*. Этот ген кодирует гликопротеин клеточной поверхности, который обычно экспрессируется на эндотелиальных клетках и клетках иммунной системы. Одной из функций системы адгезии ICAM1/LFA-1 является содействие перемещению лейкоцитов в ткани [137]. CD54 при иммуногистохимическом окрашивании был локализован в *post-mortem* ткани головного мозга при БА, прогрессирующем надъядерном параличе, боковом амиотрофическом склерозе, болезни Пика, а также в мозге без признаков неврологических заболеваний. В контроле против CD54 окрашивались только капилляры. В пораженных участках головного мозга с БА сильно окрашивалась субпопуляция реактивных астроцитов и сенильные бляшки [138]. В таких бляшках агрегаты микроглии также интенсивно окрашивались против LFA-1. Таким образом, CD54 играет важную роль во взаимодействии астроцитов и микроглии при БА.

Моделирование БА представляет собой весьма нетривиальную задачу. Ввиду многофакторных причин развития спорадической формы БА, многие аспекты патогенеза остаются неизученными. Для более полного понимания биологических процессов, протекающих при нейродегенерации, необходимо иметь комплексное представление о белках, генах и их физических и функциональных взаимодействиях. При помощи базы данных STRING [139], предназначенной для сбора, оценки и интеграции всех общедоступных источников информации о межбелковых взаимодействиях, сгенерирована сеть, в которую вошли изученные в настоящей работе белки. Они представляют узлы сети (Рис. 3). Ребра сети отражают предсказанные функциональные ассоциации узлов. Для описания параметров сети используют такие характеристики как средняя степень узла, отражающее количество взаимодействий, которое белок имеет в среднем в сети. Ожидаемое количество ребер показывает количество ребер в случайной сети, если узлы будут выбраны случайным образом. Средний локальный коэффициент кластеризации — это мера связности узлов между собой в сети. Значение r обогащения белок-белковых взаимодействий (PPI) указывает на вероятность возникновения случайных узлов в сети и на достоверность наблюдаемых ребер связи. В данной сети, средняя степень узла выше, чем ожидаемое количество ребер. Значения коэффициента кластеризации и r обогащения PPI свидетельствуют о том, что выбранные белки имеют больше взаимодействий между собой, чем можно было бы ожидать от случайного набора белков того же размера и степени распределения, взятых из генома. Такое обогащение указывает на то, что белки биологически связаны, как группа. Среди биологических процессов, классифицированных в Gene Ontology (GO) из базы данных STRING и ассоциированных с данной сетью, найдены митофагия (GO:0000423), старение (GO:0007568), клеточный ответ на азотное голодание (GO:0006995), регуляция метаболизма активных форм кислорода

(GO:2000377), клеточный ответ в результате воздействия ионов железа (GO:0010040), реакция на окислительный стресс (GO:0006979), реакция на стресс (GO:0033554) и др. Таким образом, исследуемые белки вовлечены не только в целевые процессы аутофагии и нейровоспаления, но и в смежные процессы, имеющие место быть при БА. Исследуя фармакологические агенты, важно отметить, что их влияние на узлы сети будет происходить в условиях амилоидотоксичности, которые не учитывает сеть. Однако, станет возможным проследить за динамикой белковой сети и предсказывать биологические процессы, на которые было оказано влияние. Дефицит аутофагии приводит к меньшей эффективности клиренса А β и усугубляет воспаление, вызванное фибриллами А β [140]. mTOR является известным регулятором иммунных ответов, но роль mTOR в нейровоспалении остается неясной. Одно исследование показало, что подавление mTOR его ингибитором сиролимусом уменьшает воспаление головного мозга после инсульта посредством переключения фенотипа M1-M2 микроглии [141]. В целом, микроглия M1 способствует воспалительному поражению при БА, тогда как микроглия M2 противодействует эффекту M1 и переключает микроглию с цитотоксического фенотипа на противовоспалительный.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что активация аутофагии ослабляет воспалительный ответ при нейродегенеративных заболеваниях. Таким образом, хорошо спланированные экспериментальные исследования, изучающие взаимодействие между аутофагией и воспалением, обеспечат многообещающие терапевтические стратегии.

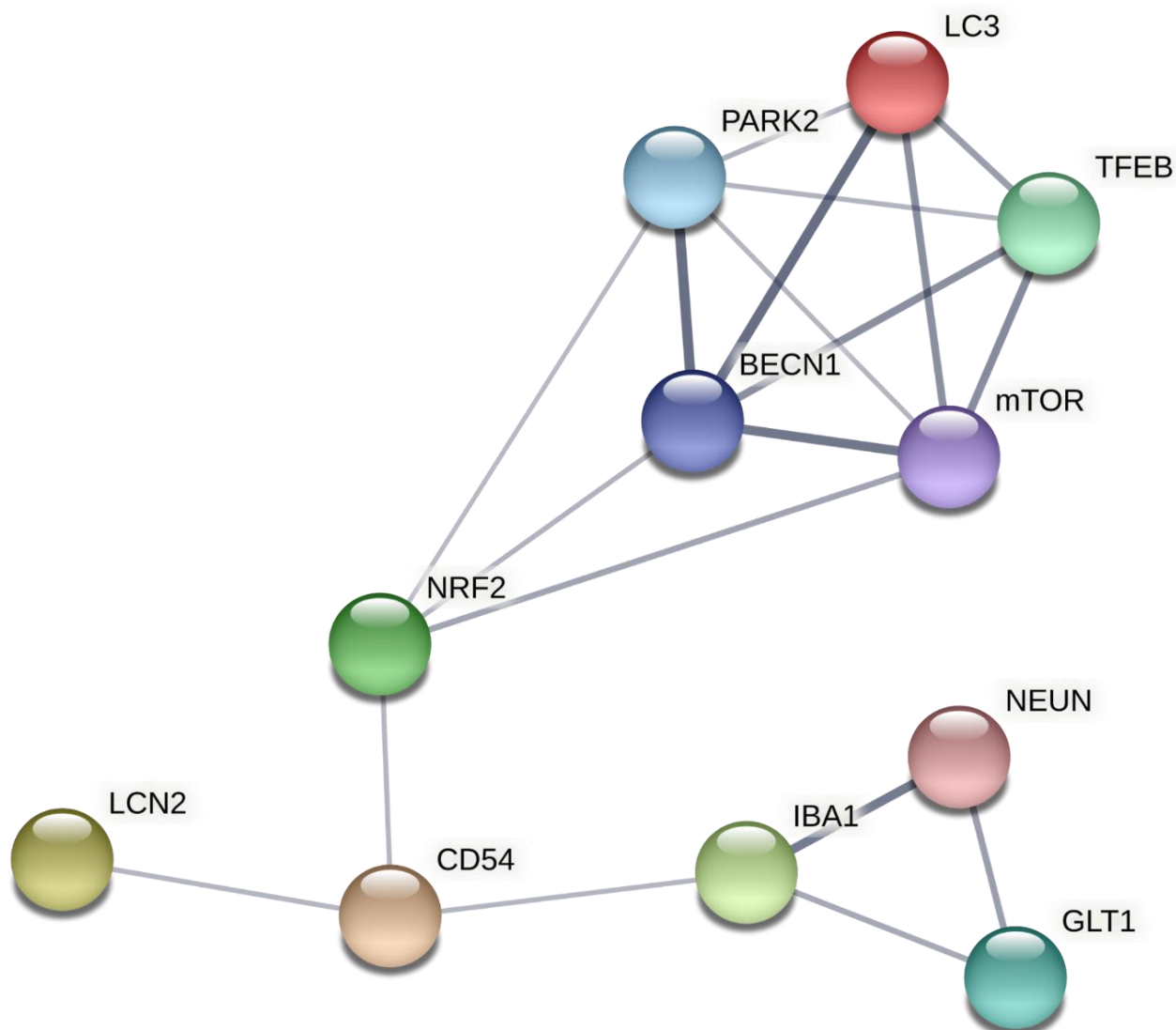


Рисунок 3. Сетевое представление исследованных белков. Узлы сети представляют собой белки, $n=11$. Ребра отражают предсказанные функциональные ассоциации, $n=19$. Толщина линии ребер указывает на степень достоверности предсказания взаимодействия: скор от 0,4 до 0,9. Средняя степень узла: 3,45. Средний локальный коэффициент кластеризации: 0,748. Ожидаемое количество ребер: 3, PPI-значение обогащения: $1,8e-10$.

Заключение

Моделируя данное заболевание центральным введением $A\beta_{O25-35}$ в боковые желудочки и в гиппокамп, станет известно, как место введения $A\beta_{O25-35}$ влияет на когнитивные нарушения, особенности накопления эндогенного $A\beta$, течения воспалительной реакции и аутофагии. Активация аутофагии и лизосомных механизмов через канонический регулятор (белок mTOR) его ос-

новным лигандом рапамицином в сочетании с индукторами mTOR-независимых путей представляется перспективной стратегией против нейродегенеративных заболеваний. Действительно, комбинация рапамицина с некоторыми mTOR-независимыми агонистами (например, с литием) или кальпастатином [142] дает положительные терапевтические результаты. Рапамицин и трегалоза обладают аддитивным терапевтическим эффектом в отношении удаления накопленных белков хантингтина и α -синуклеина *in vitro* [143]. На модели болезни Паркинсона, индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином на мышах эти препараты оказывали синергическое действие на иммуногистохимические маркеры активности аутофагии [7]. Комбинированная стимуляция mTOR-зависимого и mTOR-независимого путей аутофагии соответственно рапамицином и трегалозой еще не тестировалась в качестве лечения БА-подобной патологии *in vivo*. Поэтому в данной работе мы сравнили эффекты двух индукторов аутофагии и их комбинации на модели БА, индуцированной центральным введением A β . Патологическая агрегация и накопление A β и ассоциированное нейровоспаление в тканях головного мозга играют ключевую роль в патогенезе БА [144]. Ранние стадии БА, связанные с нарушением метаболизма амилоида и накоплением амилоидных олигомеров, являются наиболее токсичными формами амилоида, вызывающими синаптические и нейрональные дисфункции [145]. Однако потенциальное влияние Цеф на этот механизм мало изучено. Поэтому мы исследовали может ли Цеф влиять на когнитивные функции, накопление A β и связанное с ним нейровоспаление в головном мозге на ранних стадиях БА.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Животные

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с рекомендациями руководства по уходу и использованию лабораторных животных Института исследований лабораторных животных и были одобрены локальным этическим комитетом НИИНМ. Были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму количество используемых животных и их страдания. В экспериментах использовали мышей-самцов линии C57BL/6 (возраст 2 мес., 20–25 г) из ФГБНУ «НИИ нейронаук и медицины» (НИИНМ; Новосибирск, Россия). 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 выполнялись в световой фазе цикла дня. Мыши содержались по 5-6 особей в клетке.

2.2. Дизайн экспериментов

В исследовании проведено 3 эксперимента. В эксперименте № 1, посвященном анализу поведения, нейроморфологическим и нейрофизиологическим коррелятам при введении A β O25-35 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) «A β _ИЦВ» - двухстороннее введение A β O25-35 в боковые желудочки головного мозга; 5) «A β _ИГ» - двухстороннее введение A β O25-35 в область зубчатой извилины гиппокампа. Через 1 месяц после центрального введения A β O25-35 тестировали поведение в тестах открытого поля и пассивного избегания в течение недели (Рис. 4). На следующий день биопробы забирали на определение генной экспрессии (n=10) и иммуногистохимическое исследование (n=5).

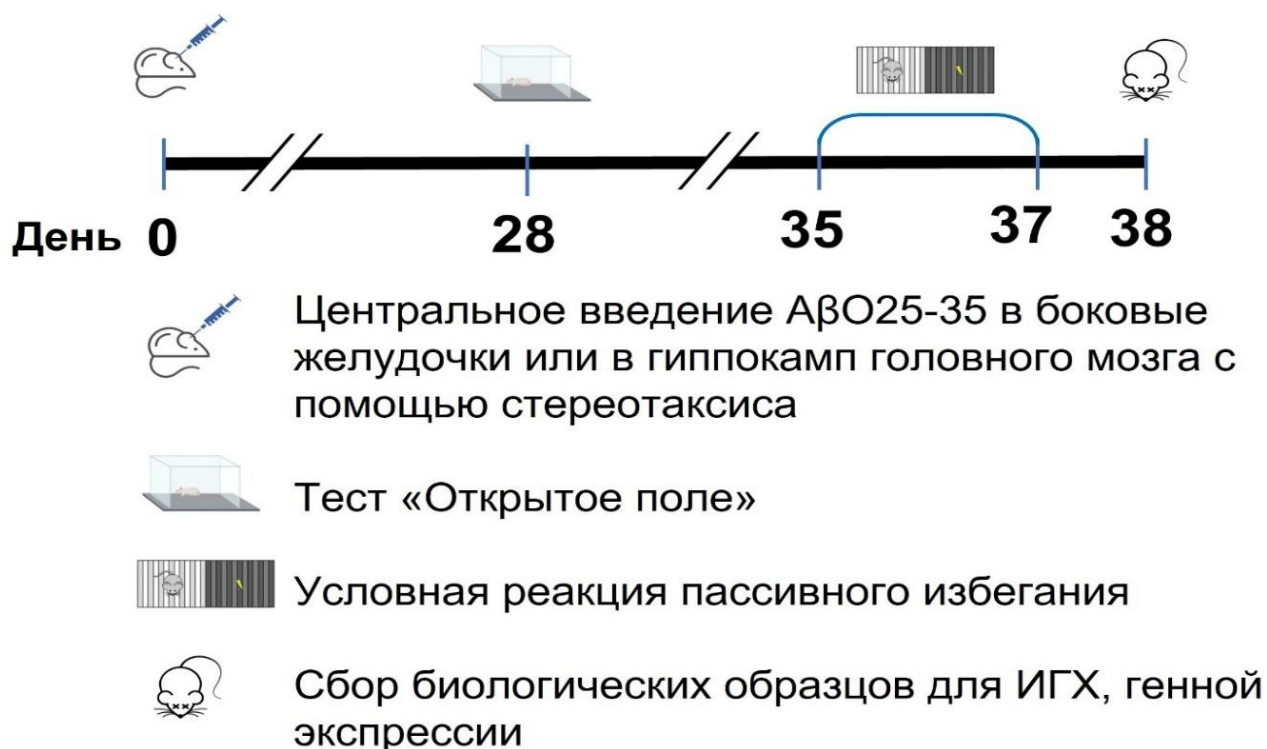


Рисунок 4. Дизайн эксперимента № 1.

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 АβО25-35 в боковые желудочки; 3) «Аβ_Трег» - двухстороннее введение АβО25-35 в боковые желудочки и ежедневное потребление 2% раствора трегалозы с питьевой водой; 4) «Аβ_Рап» - двухстороннее введение АβО25-35 в боковые желудочки и введение 10 мг/кг рапамицина, внутривентрикулярно (в/б), 7 раз через день; 5) «Аβ_Рап_Трег» - двухстороннее введение АβО25-35 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 АβО25-35 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 АβО25-35 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

неделя (Рис. 5). 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 ($n=5$).

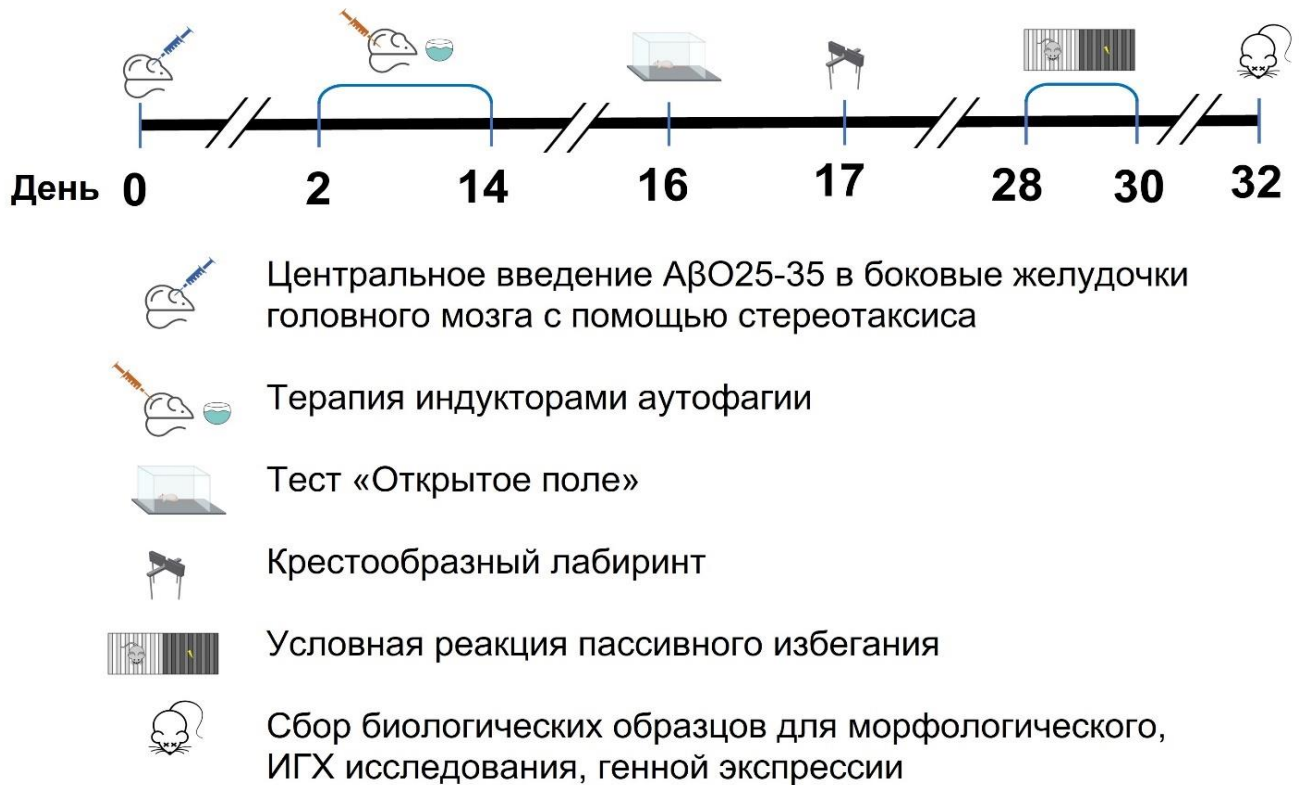


Рисунок 5. Дизайн эксперимента № 2.

В эксперименте № 3 исследовали эффекты цефалоспоринового антибиотика цефтриаксона на когнитивные дефициты, накопление Aβ, показатели нейровоспаления, плотность нейронов у мышей с центральным введением AβO25-35 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 внутрибрюшинное (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) «Aβ_Физ» - двухстороннее введение AβO25-35 и в/б введение физиологического раствора; 4) «Aβ_Цеф» – двухстороннее введение AβO25-35 и в/б введение Цеф. Стереотаксическая операция была проведена мышам в день 0 (Рис. 6). 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 А β О25-35, 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).

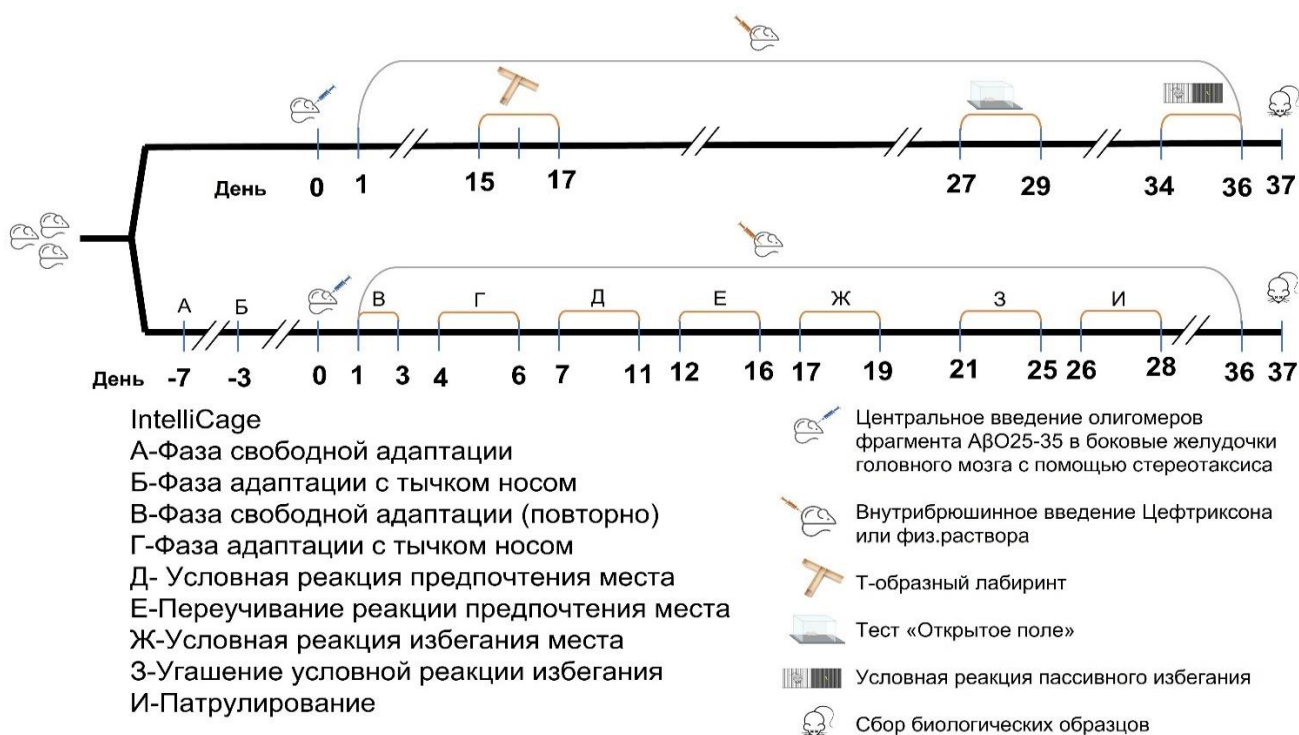


Рисунок 6. Дизайн эксперимента № 3.

2.3. Введение А β О25-35 в головной мозг

Фармакологическая модель БА воспроизводилась с помощью центрального введения олигомеров бета-амилоидных фрагментов человека А β О25-35 [146] либо в боковые желудочки (ИЦВ), либо в гиппокамп (ИГ). Фрагмент А β 25-35 (Sigma-Aldrich, США) растворяли в стерильной воде до концентрации 1 мг/мл и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования. Перед введением животным приготовленный раствор размораживали и инкубировали до образования агрегированных форм в течение 96 часов при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Препарат вводили с помощью моторизованного стереотаксиса Neurostar Stereo Drive (Neurostar, Германия). Мышей анестезировали с помощью внутрибрюшинного введения ветеринарного препарата «Золетил 100» (Virbac, Франция) в дозе 40

мг/кг. Место введения дезинфицировали 70% раствором этанола. Оперативный доступ: разрез кожи и подкожно-жировой клетчатки производили по средней линии, по стреловидному шву черепа. Водный раствор олигомеров A β O25-35 и стерильную воду вводили билатерально с помощью шприца Hamilton (25 мкл, модель 1702 RN SYR, с иглой 22s ga, 2 дюйма) и микропомпы (скорость введения 1 мкл/мин). Иглу оставляли в месте инъекции еще на 5 мин после введения. В каждый боковой желудочек головного мозга вводили 5 мкл раствора, а в каждый гиппокамп по 2,5 мкл. Всего в желудочки головного мозга вводили 10 мкг препарата, в гиппокамп – 5 мкг. Координаты введения в желудочек: AP=-0,46 мм, ML= \pm 0,9 мм, DV=2,5 мм. Координаты внедрения в гиппокамп: AP = -2,06 мм, ML = \pm 1,3 мм, DV = 2 мм [147]. После введения препаратов рану обрабатывали сульфаниламидом и ушивали стерильной полигликолидной нитью производства ООО «Линтекс» (РФ). Поверх шва наносили клей БФ-6. Животное помещали на нагретый (+40°C) матрас до полного пробуждения, а затем переводили в домашнюю клетку.

2.4. Тестирование поведения животных

Тестирование поведения на мышах проводили при искусственном освещении. В периоды между опытами животных содержали группами (по 5-6 особей). Для адаптации животных к дальнейшим манипуляциям в течение двух дней перед тестированием проводили процедуру хэндлинга. Непосредственно перед испытанием мышей осторожно переносили в комнату для тестирования, где через 10 мин после их адаптации к условиям помещения приступали к исследованию. Поведение животных регистрировали с помощью боковой и верхней цифровых видеокамер, а обработку и анализ видеозаписей проводили с помощью программного обеспечения EthoVision XT 10.1 (Noldus, Нидерланды). Арены тестовых установок очищали 20% раствором этанола и тщательно высушивали перед каждым сеансом тестирования.

2.4.1. Тест пассивного избегания

Парадигма формирования памяти о страхе - условной реакции пассивного избегания часто используется для выявления нейронных и молекулярных механизмов памяти, для изучения когнитивных нарушений при психопатологиях на экспериментальных моделях. Тестирование проводилось в системе GEMINI™ Avoidance System (San Diego Instruments, США), состоящей из

двух камер: ярко освещенной камеры, куда изначально помещается мышь, и темной камеры, соединенной со светлой камерой через перегородку. На полу темной камеры установлена металлическая решетка, проводящая электрический ток. Выполнение теста осуществлялось согласно следующему протоколу: 1-й день - габитуация (привыкание к условиям тестирования); 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, регистрируется 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 [148].

2.4.2. Тест «Открытое поле»

Этот тест проводился для оценки двигательной и исследовательской активности, тревожности и эмоциональности, согласно протоколу [7]. Регистрировались следующие параметры: общая двигательная активность (пройденное расстояние, см), тревожность (время нахождения в центре арены, с), вертикальная двигательная активность, исследовательское поведение (количество вертикальных стоек, п) и эмоциональность (количество вертикальных стоек, количество актов дефекации, п). Тест проводился в открытой прозрачной установке из оргстекла с квадратной ареной (40×40×37,5 см) при ярком освещении (1000 лк) сверху. Мышей размещали на арене у стены и регистрировали их поведение в течение 10 мин.

2.4.3. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест выполняли в соответствии с протоколом [149] с небольшими изменениями. Лабиринт крестообразной формы состоял из двух открытых (25 x 5 см) и двух закрытых рукавов (25 x 5 см) с центральной площадкой (5 x 5 см), слабо освещенной сверху (210 лк). 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.

2.4.4. Т-образный лабиринт

Тест проводили по протоколу спонтанных чередований при красном освещении 28 лк [150]. Корпус Т-образного лабиринта состоял из стартового рукава (30 x 7 см) и двух боковых рукавов (37 x 7 см) с пластиковыми стенками высотой 20 см. Зона старта в стартовом рукаве - 18×7 см, а центральная зона между боковыми рукавами составляла 7×7 см. Все отсеки были разделены автоматическими дверями, управляемыми дистанционно с помощью программного обеспечения EthoVision XT 10.1 (Noldus, Нидерланды). Тест состоял из трех попыток в день в течение трех дней подряд для каждой мыши. Каждая попытка включала два прогона с выбором. В начале

каждого прогона мышь помещали в стартовую зону. Во время каждого прогона мышь делала свободный выбор бокового рукава, входя в него. В первом прогоне, сразу после выбора, дверь, отделяющая боковой рукав с мышью, закрывалась, и мышь оставалась в выбранном рукаве 30 секунд до начала второго прогона. Во втором прогоне мышь должна была выбрать рукав, противоположный выбранному в первом прогоне (правильный выбор). Регистрировались правильные ответы в девяти попытках. Процент правильных выборов принимался за показатель рабочей памяти. Продолжительность каждой попытки ограничивалась 90 секундами.

2.4.5. Intellicage

Система Intellicage (TSE System, Германия) предназначена для автоматического мониторинга поведенческого профиля мышей в течение длительного периода времени наблюдения, в условиях домашней клетки при обычном социальном окружении без стрессирующих манипуляций экспериментатора, хэндлинга [151]. При этом анализируются индивидуальные характеристики поведения мышей. Для мышей система представляет собой клетку размером 20,5 × 55 × 37,5 см, по углам которой расположены 4 отсека размером 15×15×21 см, называемых углами. В каждом углу находится по 2 бутылки с водой (всего 8 бутылок), отделенным собственным круглым автоматическим отверстием диаметром 13 мм, снабженным сенсорами для контроля доступа к бутылкам и RFID-антенной для идентификации мышей. Для индивидуальной идентификации мышей под анестезией подкожно в межлопаточную область им имплантируется микрочип за 1-2 недели до эксперимента. Над каждой дверью установлено 3 цветных светодиода (LEDs). Доступ в углы открывается только при активации сенсора тычком носа (nosepoke) мыши. Открыв дверь, мышь может получить положительное подкрепление (питье воды) или негативную стимуляцию – поток воздуха (trigger an air puff). Носик бутылочки оборудован ликометром (lickometer), что позволяет измерять число лизаний. Четырехугольный красный домик (укрытие) расположен в середине клетки и служит в качестве места для сна и подставки для доступа к пище. Пол покрыт толстой (2-3 см) подстилкой (thick bedding). Система Intellicage позволяет тестировать одновременно до 16 мышей в течение 2 – 3 недель. Intellicage аппарат управляется компьютером с программным обеспечением, которое позволяет осуществлять запрограммированный протокол (Табл.1).

Таблица 1 - Протокол Intellicage, использованный в эксперименте № 3

<i>Стадия / тест</i>	<i>Описание</i>	<i>Продолжительность, дни</i>	<i>Дни эксперимента</i>
Свободная адаптация или габитуация	Мыши имели свободный доступ ко всем четырем углам с водой, все двери были открыты, вода и пища были в свободном доступе	4	(перед операцией)
Адаптация к тычкам	Все двери были закрыты, и мышь получала доступ к воде, ткнув носом в дверь в любом из четырех углов.	3	(перед операцией)
Стереотаксическое введение	Введение АβO25-35 или H2O в боковые желудочки.	1	День 0
Свободная адаптация или габитуация -2	Мыши имели свободный доступ ко всем четырем углам с водой, все двери были открыты, вода и пища были в свободном доступе.	3	Дни 1-3
Адаптация к тычкам -2	Все двери были закрыты, и мышь получала доступ к воде, ткнув носом в дверь в любом из четырех углов.	3	Дни 4-6
Условная реакция предпочтения места (Place learning test)	Каждая мышь имела доступ только к одному углу («правильному углу»), в котором она могла попить воды. В качестве «правильного» был выбран наименее предпочтительный угол в последний день адаптации. Фиксировался процент правильных посещений (посещений «правильного угла»).	5	Дни 7-11
Переучивание реакции предпочтения места (Place learning reversal test)	Угол, считающийся «правильным», был заменен на противоположный. Фиксировался процент правильных и неправильных посещений.	5	Дни 12-16

<p>Условная реакция избегания места (Avoidance conditioning test)</p>	<p>Мыши обучаются избегать угол, где они подвергаются авersiveному наказанию (выдувание воздуха как безусловный раздражитель) во время питья. Для каждой мыши один угол был обозначен как «неправильный угол», в котором тычок носом вызывал воздушный поток (0,8 бар, 1 с) до тех пор, пока животное не покинет угол, и дверь не закроется. Фиксировался процент некорректных посещений (заходов в «неправильный угол»).</p>	3	Дни 17-19
<p>Угашение условной реакции избегания (Avoidance extinction)</p>	<p>Мышей помещали в домашнюю клетку на один день (День 20) с ограничением воды в течение 18 часов перед возвращением в клетку Intellicage. Аверсивные стимулы не использовались. Мышь могла получить доступ к воде, ткнув носом в дверь в любом из четырех углов. Угашение избегания оценивали по посещениям угла, обозначенного как «неправильный» во время теста на избегание. Фиксировался процент посещений угла.</p>	5	Дни 21-25
<p>Патрулирование (The test for patrolling behavior)</p>	<p>Процедура этого теста заключалась в чередовании углов с доступом к воде. Мыши должны были двигаться из одного угла в другой по часовой стрелке, чтобы получить доступ к воде. Следующий угол с вознаграждением всегда был смежным к углу, который был последним. Процедура начиналась с наиболее предпочтительного угла в течение предыдущих 24 часов. При выборе мышью «правильного угла» добавлялся дополнительный сигнал (загорался желтый светодиод); затем «правильным» становился следующий угол. Когнитивная активность оценивалась по проценту посещения активного вознагражденного угла.</p>	3	Дни 26-28

2.5. Нейроморфологическое исследование

Иммуногистохимическому (ИГХ) анализу экспрессии белка-маркера аутофагии LC3-II предшествовало введение хлорохина (за 16 ч до эвтаназии, 30 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) [7]. Мышей усыпляли в камере с CO₂. Далее, транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем 4% параформальдегидом в PBS; затем их 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 срезы толщиной 30 мкм на криостате HistoSafe MicroCut – SADV (Китай).

Окраска по Нисслю

Были приготовлены коронарные срезы вдоль лобной коры [AP = 2,93 - 2,57 мм] или гиппокампа [AP = -1,91 - (-2,45) мм] мозга каждой мыши. Неокрашенные срезы мозга идентифицировали по атласу мозга мышей [152]. Окрашивание по Нисслю, обычно используемое для измерения плотности нейронов, проводили по стандартной процедуре [8]. 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 [8], поскольку прямой подсчет нейронов на срезе мозга толщиной 30 мкм затруднен: нейроны плотно упакованы. Был рассчитан процент области интереса (АОИ) в 3-м слое лобной коры (размер АОИ: 93 023 мкм²), области СА1 или СА3 гиппокампа (размер АОИ: 88 502 мкм²), зубчатой извилине (размер АОИ: 262 842 мкм²) и миндалевидном теле (размер АОИ: 314 907 мкм²), занятые окрашенными по Нисслю клетками. Оператор не был информирован о групповой принадлежности срезов.

Иммуногистохимическое исследование

Срезы мозга для этой цели случайным образом получали от тех же животных, которые использовались для гистологического определения плотности нейронов с окрашиванием по Нисслю. Анализ иммуногистохимии проводили по протоколу, подробно описанному ранее [7]. 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. Размер АОИ составил 7423 мкм² в 3-м слое лобной коры, 18208 мкм² в миндалинах или зубчатой

извилине гиппокампа, 19353 мкм² в области СА1 или 26100 мкм² в области СА3 гиппокампа. Оператор не был информирован о групповой принадлежности срезов.

2.6. Анализ экспрессии генов

Относительное количество мРНК-мишени измеряли с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР). Диссекция структур головного мозга производилась на охлаждаемой поверхности. После быстрого извлечения, образцы тканей помещали в раствор RNA later (Invitrogen, США) и хранили при -20 °С. Выделение тотальной РНК из образцов головного мозга проводили с помощью набора RNA Mini Kit (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. Оставшиеся следы геномной ДНК удаляли из образцов РНК с помощью ДНКазы I (Promega, США) в соответствии с инструкциями производителя. Обратную транскрипцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкг тотальной РНК со случайными праймерами и набором Reverse Transcription Kit («Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали по следующей программе: 37 °С (1 ч), 42 °С (30 мин) и 50 °С (10 мин). Фермент инактивировали нагреванием смеси при 90°С в течение 5 мин. Последовательности специфических праймеров (ООО «Биосинтез», Россия) для исследуемых генов конструировали с использованием Primer 3 (NCBI). кПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл. Реакционная смесь содержала мастер-микс с SYBR Green из набора PCR Mix («Синтол», Россия), прямой и обратный праймеры (по 150 нМ) и матрицу кДНК. Последовательности праймеров, размеры ампликонов приведены в таблице 2.

Количественную ПЦР проводили на термоциклере LightCycler-480 II (Roche, Швейцария) по следующей схеме: начальная денатурация 5 мин при 95 °С, затем 40–50 циклов по 15 с при 95 °С, 40 с при температуре отжига праймеров, получение сигнала флуоресценции в течение 10 с, а затем построение кривой плавления от 60 до 95 °С. Был применен метод количественного определения стандартной кривой [153]. Относительное количество тестируемой кДНК определяли с использованием калибровочных кривых, полученных из разведений стандартной кДНК. Стандартный раствор кДНК для построения калибровочных кривых готовили путем смешивания аликвот каждого образца синтезированной кДНК. В каждом эксперименте образцы кДНК с праймерами, специфичными либо для гена-мишени (в трех экземплярах на образец кДНК), либо для референсного гена, и стандартные разведения кДНК (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16), 1:32, 1:64 и 1:128) с праймерами для этого гена (в повторах) помещали в лунки одного и того же многолуночного

планшета. Затем значение экспрессии для целевого гена нормализовали к среднему геометрическому уровню мРНК референсных генов.

Таблица 2 - Последовательности праймеров, использованных в кПЦР для анализа экспрессии генов

Символ гена	Последовательность (5'-3')		Размер ампликона
Целевые гены			
<i>Aif1</i>	F: GGATTTGCAGGGAGGAAAAG	R: TGGGATCATCGAGGAATTG	92
<i>Atg8</i>	F: AAAGAGTGGAAGATGTCCGGC	R: ACCAGGAACTTGGTCTTGTCC	118
<i>Becn1</i>	F: GAACTCACAGCTCCATTA	R: ATCTTCGAGAGACACCATCC	121
<i>Lcn2</i>	F: AATAGCTACAATGTCACCTCC	R: CGAACTGGTTGTAGTCCG	178
<i>Nrf2</i>	F: AAACAGGAGAATTCCTCCCAA	R: CAAGCGACTCATGGTCATCTA	174
<i>Park2</i>	F: GGTCCAGTTAAACCCACCTAC	R: TTAAGACATCGTCCCAGCAAG	154
Референсные гены			
<i>B2m</i>	F: GTCTTTCTATATCCTGGCTCA	R: ATGCTTGATCACATGTCTCG	129
<i>Gapdh</i>	F: TGTCCGTCGTGGATCTGA	R: GCTGTTGAAGTCGCAGGA	146
<i>Nono</i>	F: AAAGGCTTTGGCTTTATTCGC	R: CAGAAAAGGCTTCTTCCAGCA	184
<i>Ppia</i>	F: AAAGTTCCAAAGACAGCAGAAAA	R: GCCAGGACCTGTATGCTTTAG	207

2.7. 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 Rstudio (пакеты *rstatix*, *tidyr*, *ggpattern*, *ggplot2*, *ggpubr*) и представлены в виде боксов с границами между первым и третьим квартилем, медианой, усами с максимумом и минимумом. Столбчатые диаграммы представлены в виде среднего \pm ошибка среднего. Статистически значимым считали уровень $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты исследования

3.1. Сравнение когнитивных дефицитов, накопления А β , показателей нейровоспаления, плотности нейронов, активации аутофагии в структурах мозга мышей при введении А β O25-35 в боковые желудочки мозга или в гиппокамп

3.1.1. Анализ поведения мышей после двухстороннего введения А β O25-35 в боковые желудочки 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 ($F(1,63) = 0,13$, $p > 0,05$). Отмечено, что все экспериментальные группы обучились, что отразилось в достоверном увеличении латентного времени перехода (Рис. 7) при сравнении данного показателя в день обучения и в день тестирования, согласно t-тесту для зависимых выборок ($p < 0,001$). В то же время у мышей, составляющих группы с моделью БА («А β _ИЦВ» и «А β _ИГ») отчетливо обнаруживается дефицит воспроизведения реакции в день тестирования, при сравнении с соответствующими группами введения растворителя («Раст_ИЦВ» и «Раст_ИГ»), согласно post hoc тесту по Тьюки ($p < 0,001$). Таким образом, мыши, получавшие А β O25-35, хуже формировали устойчивую ассоциацию между контекстом экспериментальной установки и опасностью темного отсека, где они получали болезненное наказание. Следует отметить, что в день обучения достоверных различий между группами по этому показателю не было, согласно post hoc тесту по Тьюки ($p > 0,05$).

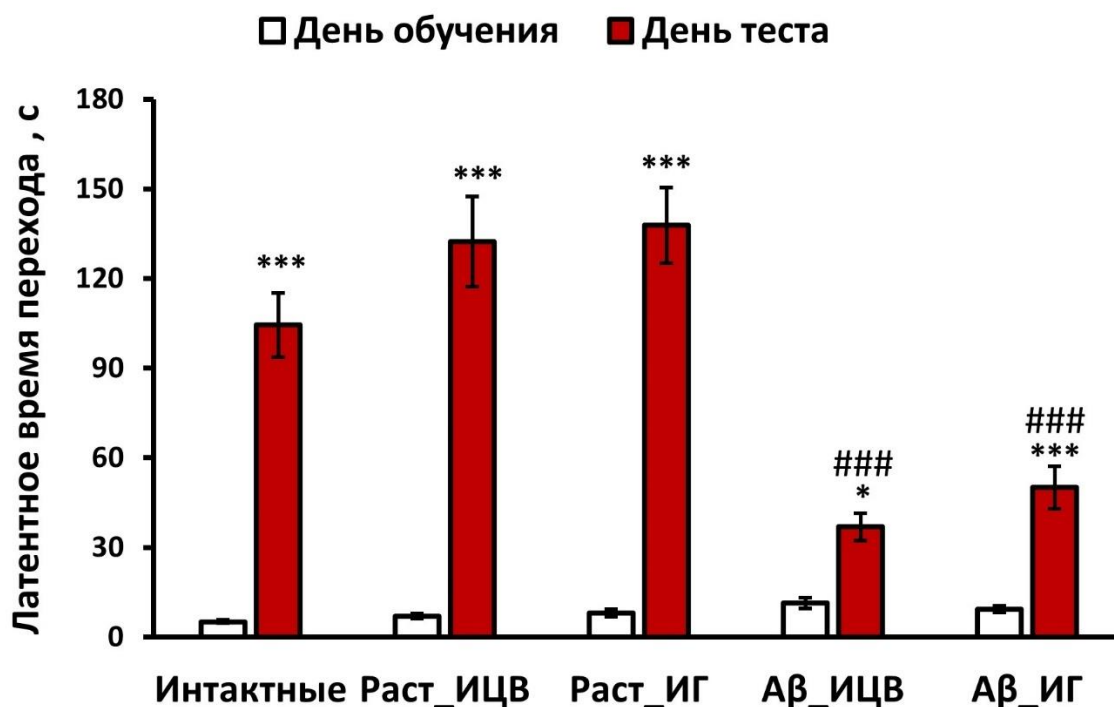


Рисунок 7. Влияние введения АβО25-35 в боковые желудочки (ИЦВ) или в гиппокамп (ИГ) на показатель памяти и обучения в тесте условного пассивного избегания у мышей С57BL/6. Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего. Белые столбики - латентное время перехода в темный отсек на этапе обучения (до получения удара током), красные столбики - латентное время перехода в темный отсек в день проведения теста (через 24 часа после получения удара током в темном отсеке). Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по сравнению с уровнем в день обучения; ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст_ИЦВ» и «Раст_ИГ»)

Влияние введения АβО25-35 на когнитивные функции не было связано с неспецифическим влиянием на общую двигательную и исследовательскую активность, так как в тесте «Открытое поле» не было выявлено достоверных межгрупповых различий (Табл. 3) по пройденному расстоянию (показатель общей горизонтальной двигательной активности) или количеству стоек (показатель вертикальной двигательной активности и исследовательской активности). Также не выявлено достоверного влияния экспериментальных воздействий на показатели эмоциональности мышей (количество актов дефекации) или тревожности (время нахождения в центре).

Таблица 3 - Влияние введения А β О25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп на поведение мышей линии C57BL/6 в тесте «Открытое поле». Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего

Показатель	Группы				
	Интактные	Раст_ИЦВ	Раст_ИГ	А β _ИЦВ	А β _ИГ
Пройденный путь, см	2703,9 \pm 120,5	2376,9 \pm 208,3	2357,4 \pm 161,5	2397,5 \pm 145,4	2643,4 \pm 189,8
Количество стоек, n	69,6 \pm 4,8	48,5 \pm 6,6	52,3 \pm 7,2	52,6 \pm 5,3	48,8 \pm 3,8
Время в центре арены, с	31,4 \pm 2,5	41,3 \pm 3,5	31,1 \pm 4,0	36,5 \pm 4,1	39,8 \pm 3,8
Количество актов дефекации, n	4,7 \pm 0,6	4,9 \pm 0,7	2,8 \pm 0,6	2,8 \pm 0,5	3,8 \pm 0,7

3.1.2. Анализ накопления А β , показателей нейровоспаления, плотности нейронов по маркеру NEUN после введения А β О25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп

Анализ накопления А β после введения А β О25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил 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 ($F(4,14) = 29,35, p < 0,001$). Апостериорный post hoc test по Тьюки выявил увеличение накопления А β в группе «А β _ИЦВ» по сравнению с группой «Раст_ИЦВ» ($p < 0,01$), «А β _ИГ» по сравнению с группой «Раст_ИГ» ($p < 0,01$) в гиппокампе ($p < 0,05$) и во фронтальной коре ($p < 0,001$, Рис. 8). Несмотря на введение амилоида непосредственно в гиппокамп, накопление во фронтальной коре было более выраженным. Экспериментальные группы с введением амилоида показали увеличение накопления амилоида по сравнению с соответствующими группами с введением растворителя и интактной группой ($p < 0,001$).

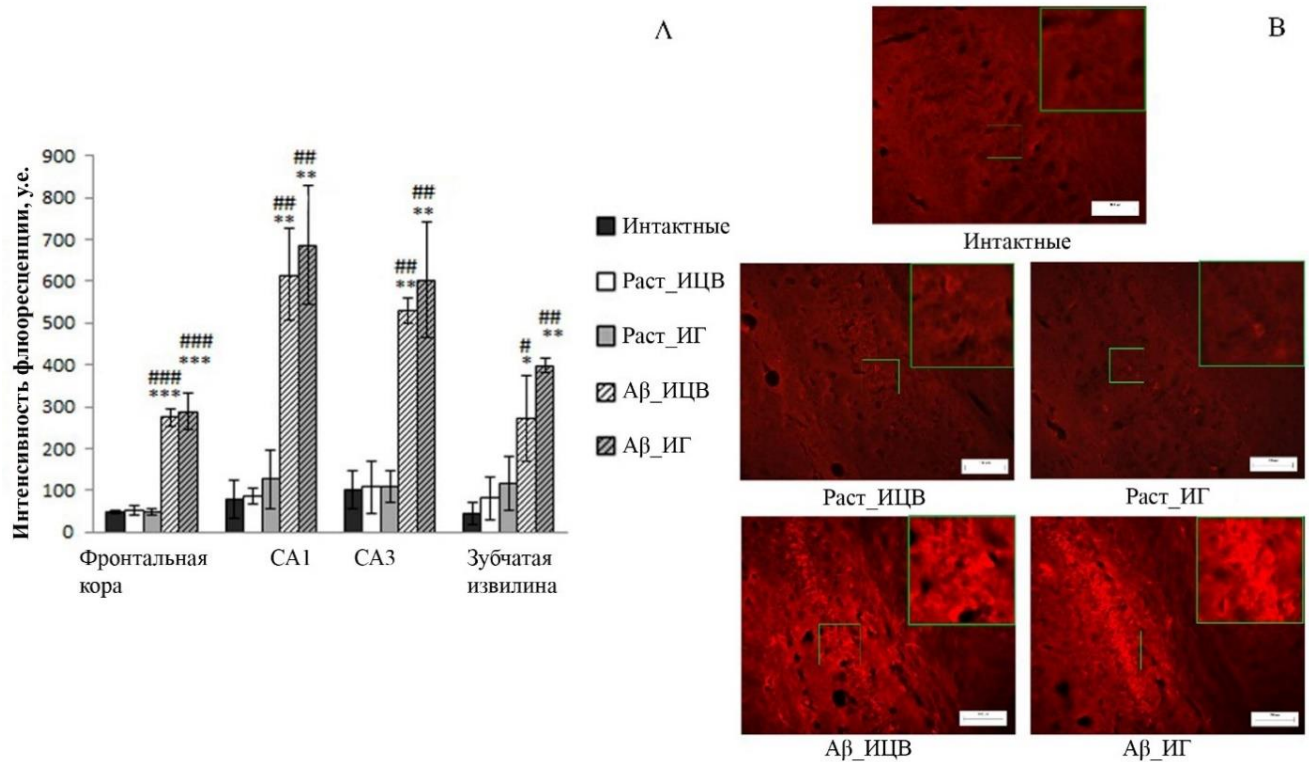


Рисунок. 8. Влияние введения АβO25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп на накопление Аβ во фронтальной коре, зонах СА1, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа головного мозга мышей линии C57BL/6. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены как среднее ± ошибка среднего. N=3-4 в группе. На микрофотографиях (Б) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против Аβ в СА1 зоне гиппокампа. Увеличение - 200×, шкала 100 μm. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ 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»).

В дополнение к ожидаемому увеличению содержания Аβ у мышей, которым центрально вводили АβO25-35, в этих областях мозга наблюдалось значительное усиление нейровоспаления в виде активации микроглии (Рис. 9). Следует отметить, что выявлено не только увеличение экспрессии микроглиального маркера IBA1, но и переход микроглии из покоящегося состояния в активированное, характеризующееся увеличением тела микроглиальных клеток и укорочением отростков. Примечательно, что накопление Аβ положительно коррелирует с активацией микроглии в зоне СА1 гиппокампа ($r_s = 0,72$, $p < 0,01$) и во фронтальной коре ($r_s = 0,8$, $p < 0,001$)

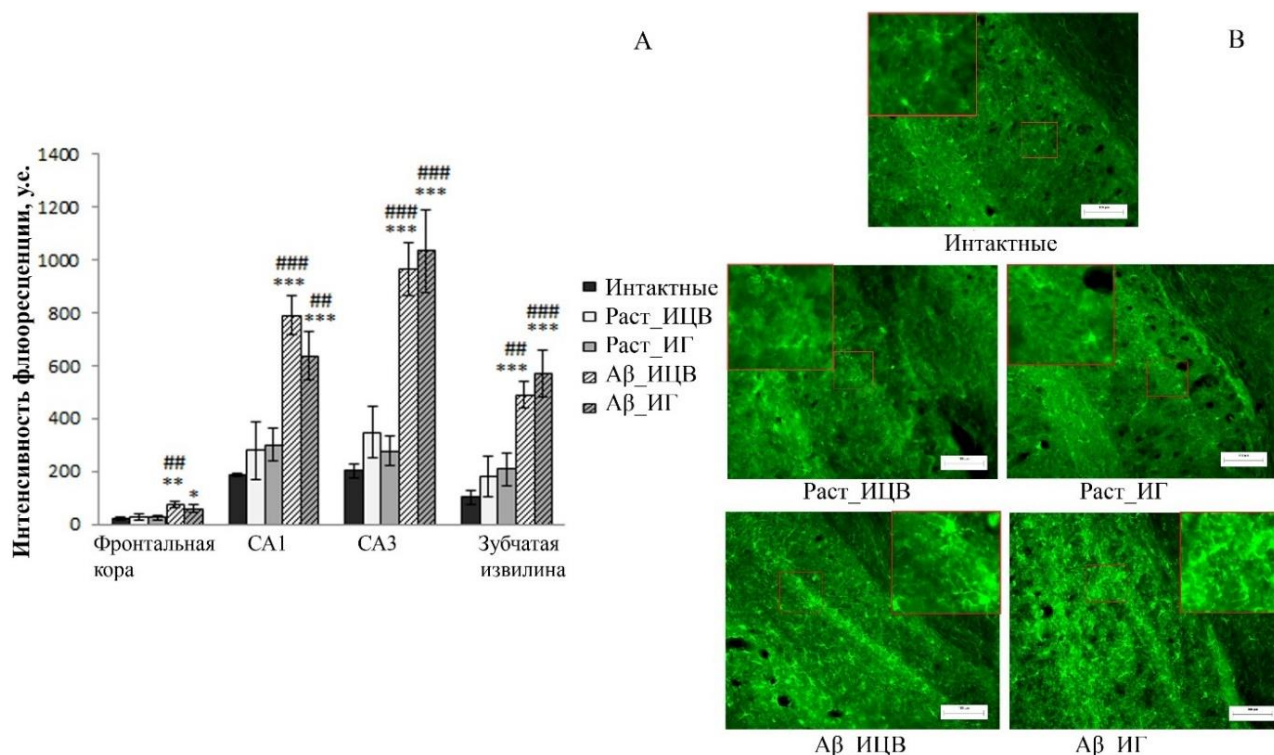


Рисунок 9. Влияние введения AβO25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп на активацию микроглии во фронтальной коре, зоне CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа мышей C57BL/6. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены как среднее ± ошибка среднего. N=3-4 в группе. На микрофотографиях (В) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против маркера микроглии IBA1. Увеличение – 200×, шкала 100 μм. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ по сравнению с группой «Интактные»; ### $p < 0,01$, #### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой растворителя («Раст_ИЦВ» и «Раст_ИГ»).

Анализ экспрессии генов, связанных с нейровоспалением (*Aif1*, *Lcn2*, *Nrf2*) после введения AβO25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп

По данным t-критерия с поправками Бонферрони выявлено достоверное повышение уровня экспрессии гена *Aif1* в миндалине мышей в группе «Aβ_ИЦВ» по сравнению с интактной группой ($p < 0,01$) и по сравнению с группой «Раст_ИГ» ($p < 0,01$). В то же время в лобной коре и гиппокампе различий по t-критерию с поправками Бонферрони не выявлено (Рис. 10). Что касается гена *Lcn2*, то в лобной коре обнаружено достоверное повышение уровня его экспрессии в группе «Раст_ИЦВ» по сравнению с интактной группой ($p < 0,01$) в 4,08 раз и группой «Раст_ИГ» ($p < 0,01$) в 4,59 раз, согласно t-критерию с поправкой Бонферрони (Рис. 10). U-тест с поправками Бонферрони выявил достоверное повышение уровня экспрессии гена *Lcn2* в гиппокампе мышей

в группе «Раст_ИЦВ» по сравнению с группой интактных ($p < 0,01$) и по сравнению с группой «Раст_ИГ» ($p < 0,01$). Кроме того, U-тест с поправками Бонферрони показал увеличение уровня экспрессии гена *Lcn2* в группе «А β _ИЦВ» по сравнению с интактной группой ($p < 0,01$) в 3,56 раз. Достоверных различий в уровнях экспрессии гена *Lcn2* в миндалевидном теле мышей обнаружено не было. Экспрессия гена *Nrf2* не изменялась ни в лобной коре, ни в гиппокампе, ни в миндалевидном теле (Рис. 10).

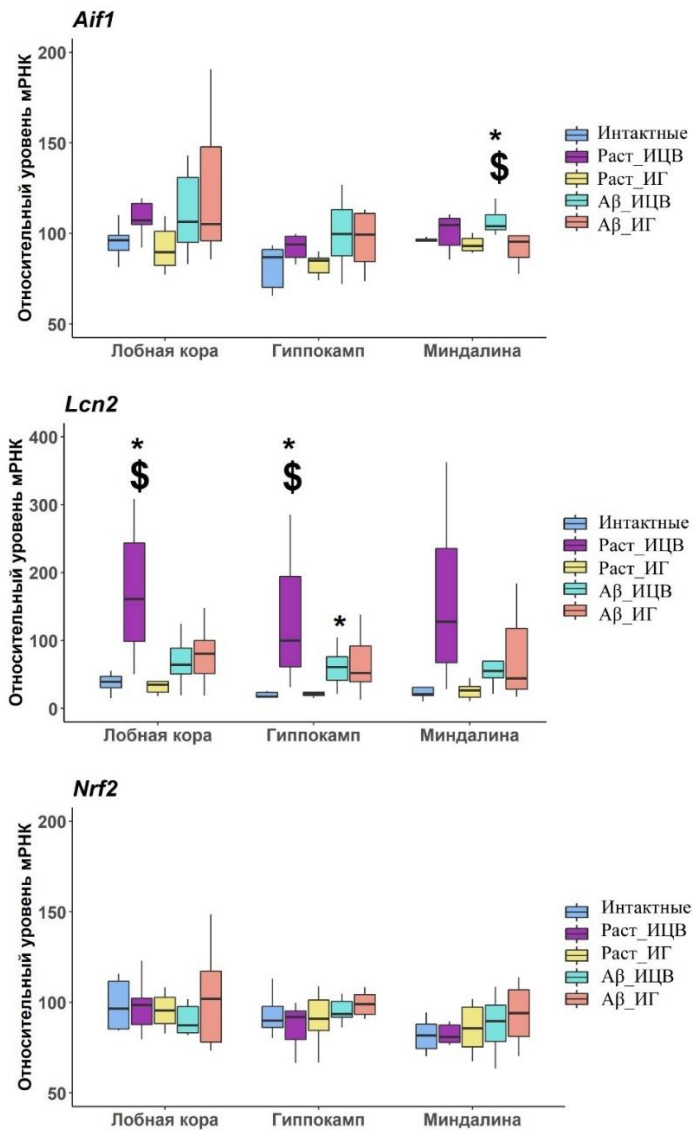


Рисунок 10. Влияние введения А β О25-35 и воды в боковые желудочки или в гиппокамп на уровни экспрессии мРНК генов *Aif1*, *Lcn2*, *Nrf2* в лобной коре, гиппокампе и миндалевидном теле мышей C57BL/6. Данные представлены в виде коробчатой диаграмм с первым (Q1 или 25-й процентиль) и третьим квантилями (Q3 или 75-й процентиль), медианой и усами значений, полученных в независимой группе животных ($n = 6-8$ в группе). Статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони: * $p < 0,01$ по сравнению с интактной группой; \$ $p < 0,01$ по сравнению с группой «Раст_ИГ».

Анализ плотности нейронов после введения A β O25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил различий в экспрессии нейронального маркера NEUN между экспериментальными группами ни в СА1 зоне ($F(1,14) = 1,47, p > 0,05$), ни в СА3 зоне ($F(1,14) = 0,69, p > 0,05$) гиппокампа (Рис. 11). Однако, удалось обнаружить достоверное повышение экспрессии NEUN во фронтальной коре в группе «A β _ИГ» по сравнению с группой «Раст_ИГ» ($p < 0,05$), а в группе «Раст_ИГ» ($p < 0,01$) понижение по сравнению с интактными животными, согласно post hoc тесту по Тьюки. Данные изменения, вероятно, обусловлены изолированным снижением экспрессии NEUN в группе «Раст_ИГ» и не могут рассматриваться как биологический эффект введения амилоида на экспрессию NEUN, поскольку разница между интактными животными и группами с введением амилоида отсутствует.

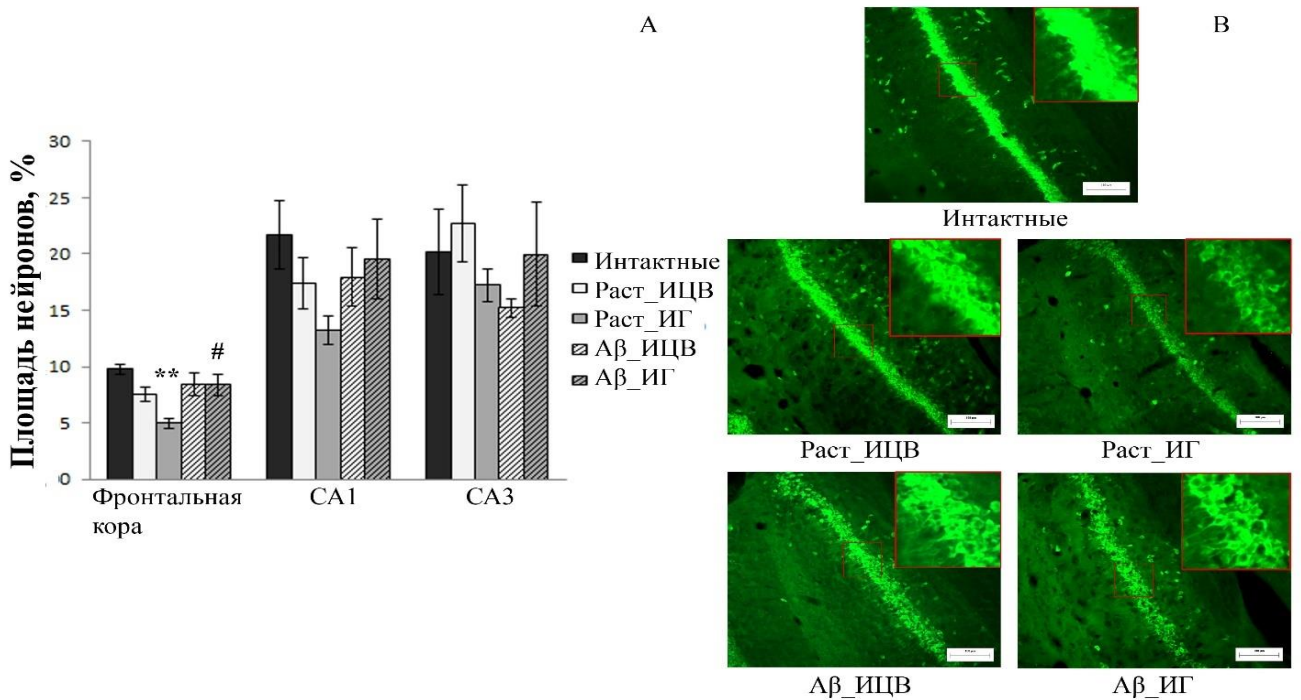


Рисунок 11. Влияние введения A β O25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп на показатели плотности нейронов во фронтальной коре, зонах СА1, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа мышей C57BL/6. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены как среднее \pm ошибка среднего). N=3-4 в группе. На микрофотографиях (В) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против NEUN. Увеличение - 200 \times , шкала 100 μ m. Статистически значимые различия: ** $p < 0,01$ по сравнению с группой «Интактные»; # $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой растворителя «Раст_ИГ».

3.1.3. Анализ активности аутофагии после введения A β O25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил различия экспрессии LC3-II между экспериментальными группами во фронтальной коре ($F(4,11) = 5,31, p < 0,05$). Апостериорный post hoc тест по Тьюки выявил разницу между группой «A β _ИГ» и интактными животными ($p < 0,01$). Разница между «A β _ИГ» и «Раст_ИГ» ($p = 0,055$), а также «A β _ИГ» и «A β _ИЦВ» ($p = 0,057$) наблюдалась на уровне тенденции, согласно post hoc тесту по Тьюки. В гиппокампе, не обнаружено достоверное увеличение экспрессии LC3-II (Рис. 12).

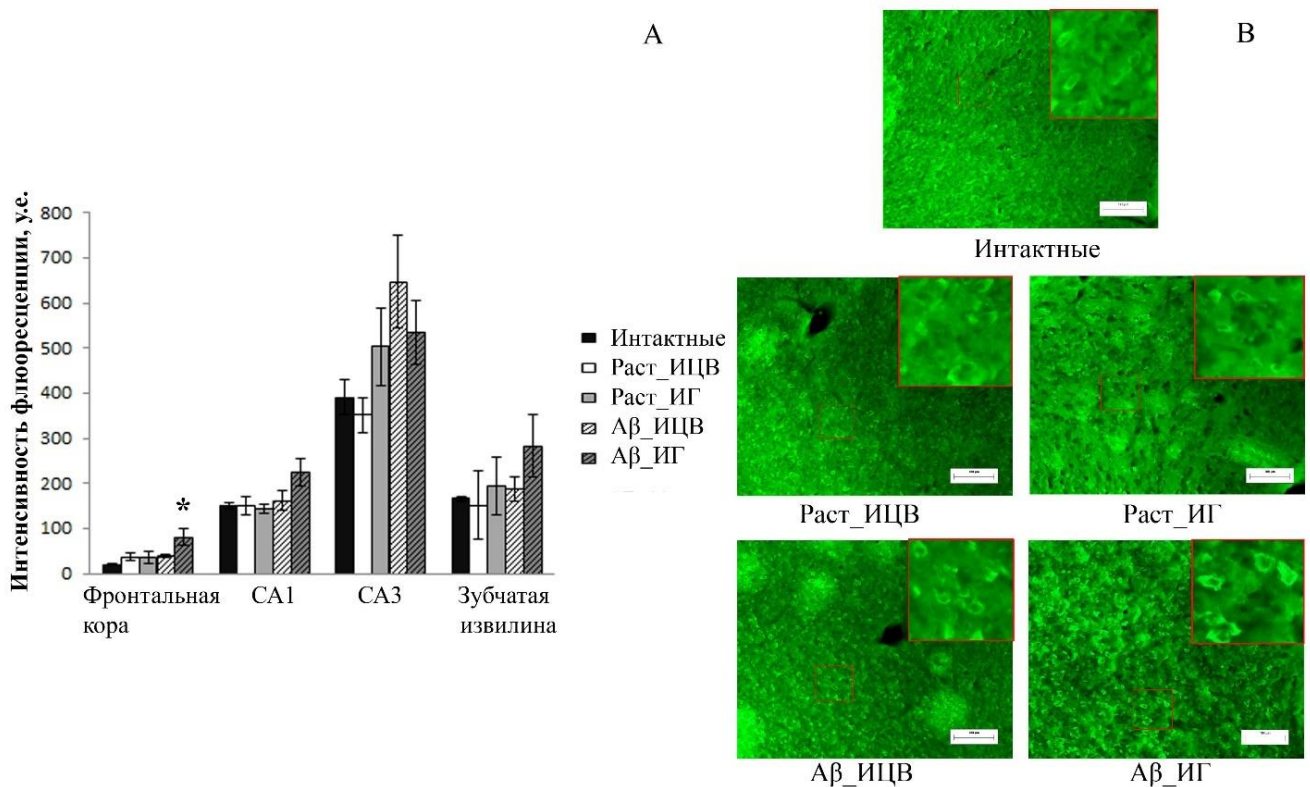


Рисунок 12. Влияние введения A β O25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп на показатели аутофагии (LC3-II) в лобной коре, областях CA1 и CA3 и зубчатой извилине гиппокампа C57BL/6 мышей. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены как среднее \pm ошибка среднего). N=3-4 в группе. На микрофотографиях (В) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против LC3-II. Увеличение - 200 \times , шкала 100 μ m. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Интактные».

Анализ экспрессии генов, связанных с аутофагией (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*) после введения АβO25-35 в боковые желудочки или в гиппокамп

Экспрессия гена *Atg8* и *Becn1* не изменялись ни во фронтальной коре, ни в гиппокампе, ни в миндалевидном теле в соответствии с t-критерием и U-тестом с поправкой Бонферрони (Рис. 13). Т-тест с поправкой Бонферрони выявил достоверное снижение уровня экспрессии гена *Park2* во фронтальной коре в группе «Аβ_ИГ» по сравнению с интактной группой ($p < 0,01$). В миндалевидном теле уровень экспрессии гена *Park2* в группе «Аβ_ИЦВ» наблюдался на более высоком уровне, чем в группе «Раст_ИЦВ» по t-критерию с поправкой Бонферрони ($p < 0,01$).

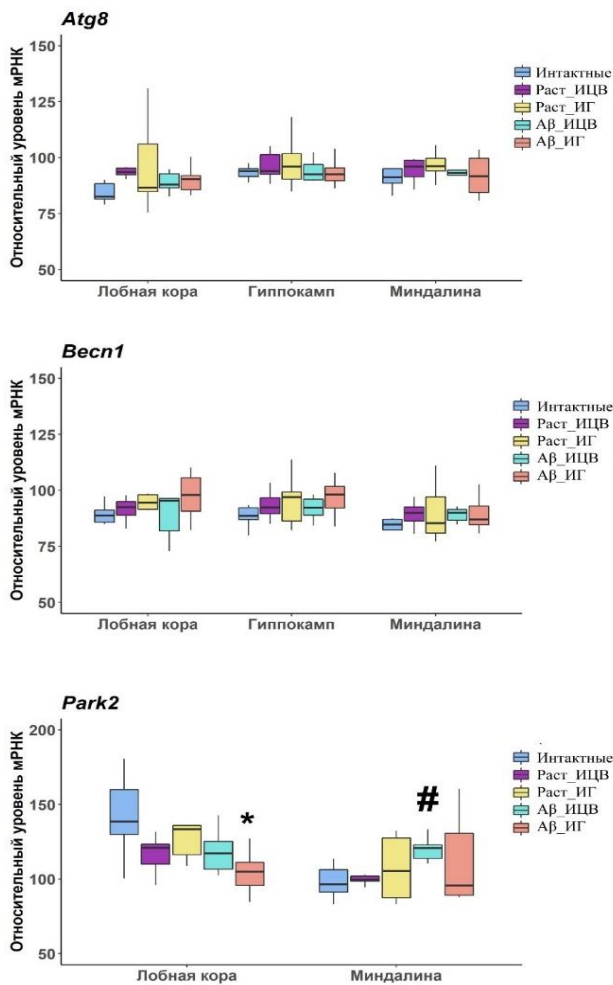


Рисунок 13. Влияние введения АβO25-35 и растворителя в боковые желудочки или в гиппокамп на уровни экспрессии генов *Atg8*, *Becn1*, *Park2* в лобной коре, гиппокампе и миндалевидном теле мышей C57BL/6. Данные представлены в виде коробчатых диаграмм с первым (Q1 или 25-й процентиль) и третьим квартилями (Q3 или 75-й процентиль), медианой и усами значений, полученных в независимой группе животных ($n = 6-8$ в группе). Статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони: * $p < 0,01$ по сравнению с интактной группой; # $p < 0,01$ по сравнению с группой «Раст_ИЦВ».

3.2. Изучение эффектов совместной активации mTOR-зависимой (рапамицин) и mTOR-независимой (трегалоза) аутофагии в качестве терапевтического подхода у мышей на нейротоксической модели БА

3.2.1. Анализ поведения мышей на нейротоксической модели БА после введения рапамицина и трегалозы

Оценка общей двигательной активности проводилась с помощью теста «Открытое поле» (Рис. 14А). Экспериментальные группы достоверно не различались по пройденному расстоянию ($F(4, 65) < 1$). Следовательно, поведенческие эффекты препаратов в остальных тестах были специфичными и не зависели от общей двигательной активности животного. В тесте крестообразного лабиринта выявлено достоверное влияние фактора лечения ($F(4, 62) = 3,76, p < 0,01$) на основной показатель тревожности (время, проведенное в открытых рукавах, Рис. 14В). Введение АβО25-35 приводило к значительному снижению параметра по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$), в то время как, только совместное применение рапамицина и трегалозы предотвращало этот анксиогенный эффект.

Эффективность рапамицина и трегалозы в восстановлении когнитивной функции оценивалась с помощью теста пассивного избегания (Рис. 14С). Выявлено достоверное влияние фактора лечения ($F(4, 51) = 7,51, p < 0,001$), обучения (повторные измерения) ($F(1, 51) = 276,7, p < 0,001$) и взаимодействия. Между этими факторами ($F(4, 51) = 8,15, p < 0,001$) на показатель латентного времени перехода. Латентное время перехода в темный отсек в день обучения (до удара эл. током) достоверно не различалось между экспериментальными группами. В качестве доказательства обучения в день тестирования, через 24 часа после удара эл. током, контрольная группа продемонстрировала заметное увеличение латентного времени перехода, по сравнению с этим же показателем в день обучения ($p < 0,001$). В отличие от контрольной группы, латентное время перехода в день тестирования было резко снижено у мышей группы «Аβ» ($p < 0,001$), что указывает на нарушение памяти. Индукторы аутофагии полностью восстанавливали данный поведенческий ответ. Все три типа лечения (только рапамицин, или только трегалоза, или их комбинация) заметно улучшили дефицит обучения, о чем свидетельствует более длительное латентное время перехода по сравнению с группой «Аβ» ($p < 0,001$). Тем не менее, не наблюдалось аддитивного терапевтического эффекта для комбинации рапамицина и трегалозы.

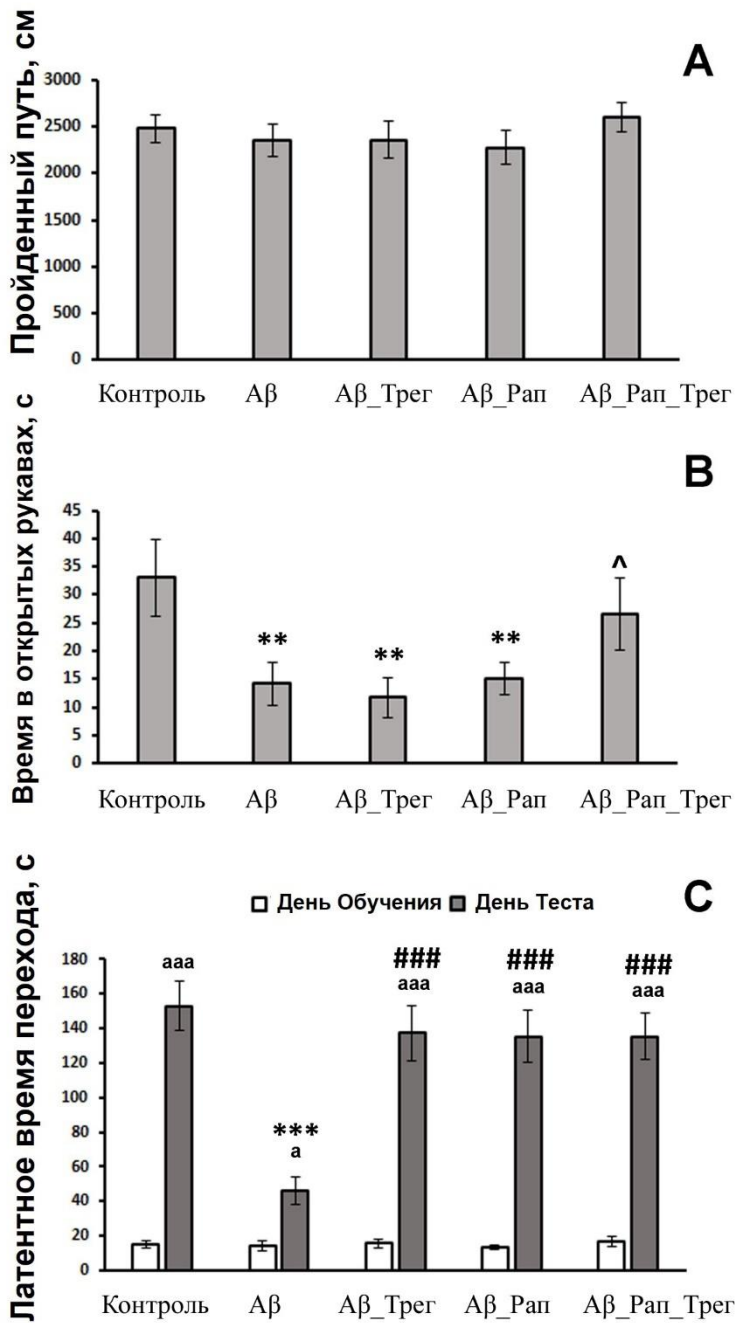


Рисунок 14. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации на двигательную активность (пройденное расстояние) в тесте «Открытое поле» (А), тревожность в тесте «Крестообразный лабиринт» (В) и обучение в тесте пассивного избегания (С) у мышей на Аβ-индуцированной модели БА. Данные выражены как среднее \pm ошибка среднего, полученные в независимой группе животных ($n = 9-17$ на группу). Статистически значимые различия: a $p < 0,05$, aaa $p < 0,001$ по сравнению со значениями в день обучения; $**$ $p < 0,01$, $***$ $p < 0,001$ по сравнению с группой «Контроль»; $###$ $p < 0,001$ по сравнению с группой «Аβ»; $^$ $p < 0,05$ по сравнению с группой «Аβ_Трег».

3.2.2. Анализ накопления А β , активации микроглии, плотности нейронов на нейротоксической модели БА после введения рапамицина и трегалозы

Анализ накопления А β на нейротоксической модели БА после введения рапамицина и трегалозы

Накопление А β оценивали по флюоресценции сигнала во фронтальной коре, СА1 и СА3 зоне гиппокампа, зубчатой извилине, миндалине (Рис. 15). Экспериментальные группы достоверно различались по уровням А β во фронтальной коре ($F(6, 19) = 2,9, p < 0,05$), зоне СА1 гиппокампа ($F(6, 18) = 3,5, p < 0,05$), зоне СА3 гиппокампа ($F(6, 19) = 3,4, p < 0,05$). Уровни А β были значительно увеличены в группах, получавших А β О25-35, по сравнению с контролем во фронтальной коре ($p < 0,01$), зоне СА1 ($p < 0,01$) и зоне СА3 гиппокампа ($p < 0,05$). Накопление А β было достоверно снижено под действием трегалозы, рапамицина или их комбинированного применения. Однако эффект изолированного или совместного применения достоверно не отличался, в то время как введение 3-МА подавляло эффекты индукторов аутофагии, поскольку уровни А β в группах, получавших 3-МА, не отличались от таковых в группе, получавшей А β О25-35.

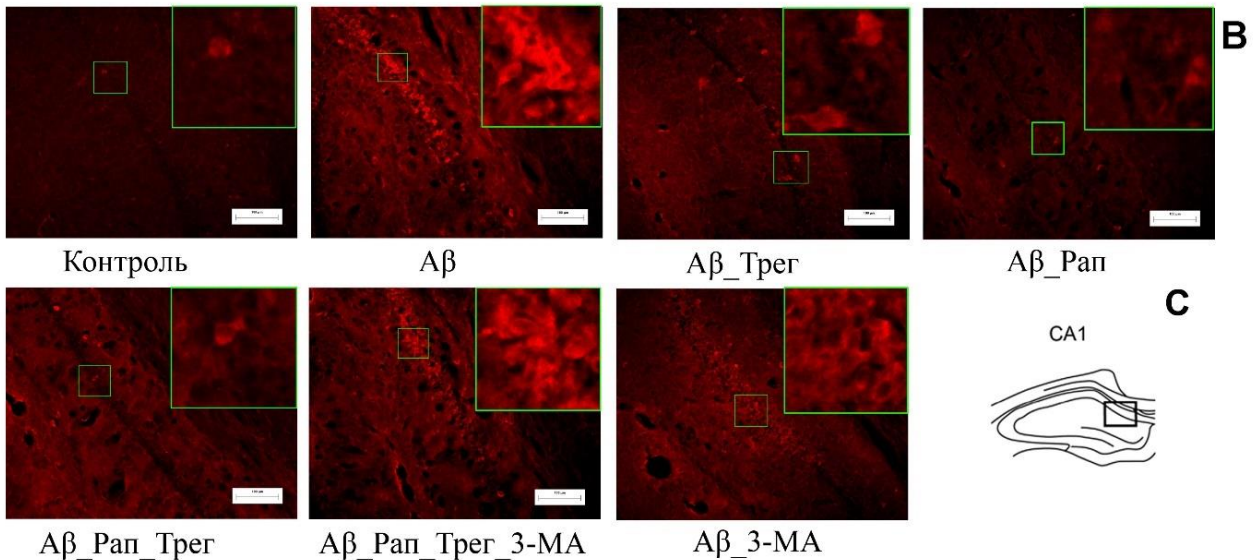
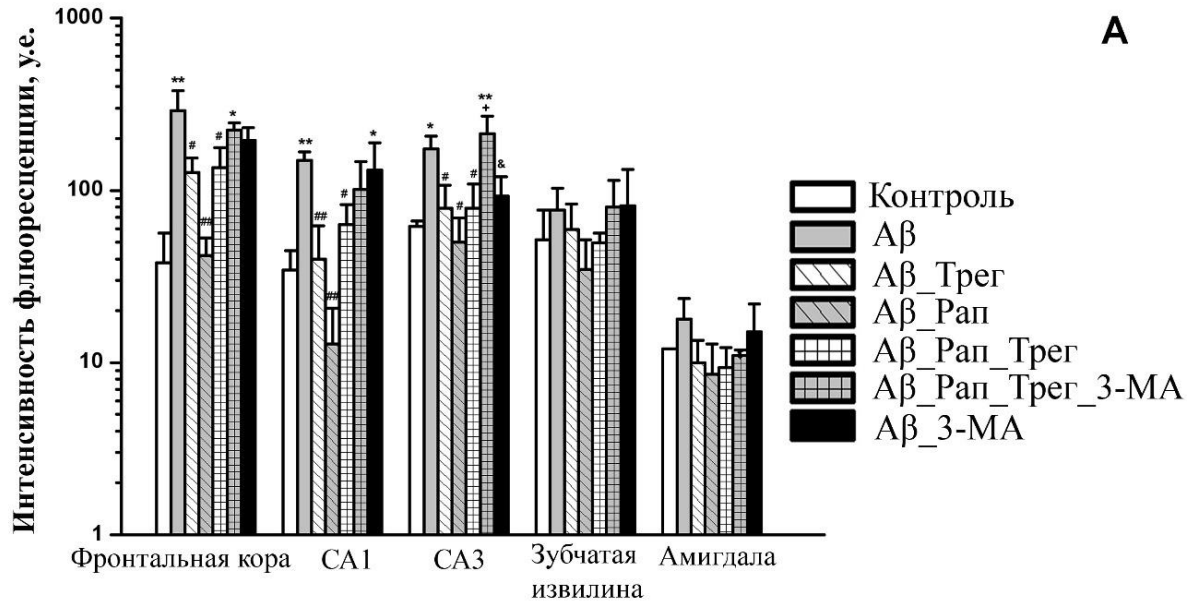


Рисунок 15. Влияние рапамицина, трегалозы, 3-метиладенина или их комбинации в отношении накопления Aβ. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены как среднее значение ± ошибка среднего. N=3-5 в группе. На микрофотографиях (B) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против Aβ в зоне CA1 гиппокампа. Увеличение 200×; шкала 100 μм. Прямоугольник в (C) указывает область, показанную в (B). Статистически значимые различия: * p < 0,05, ** p < 0,01 по сравнению с группой «Контроль»; # p < 0,05, ## p < 0,01 по сравнению с группой «Aβ»; + p < 0,05 по сравнению с группой «Aβ_Рап_Трег»; & p < 0,05 по сравнению с группой «Aβ_Рап_Трег_3-МА».

Анализ активации микроглии по маркеру IBA1 на нейротоксической модели БА
после введения рапамицина и трегалозы

Активацию микроглии оценивали по флюоресценции маркера микроглии IBA1 во фронтальной коре, гиппокампе, миндалине (Рис. 16). Экспериментальные группы достоверно различались по экспрессии IBA1 во фронтальной коре ($F(4, 14) = 11,8, p < 0,001$), зоне СА1 гиппокампа ($F(4, 12) = 4,7, p < 0,05$), зоне СА3 гиппокампа ($F(4, 12) = 3,3, p < 0,05$), зубчатой извилине ($F(4, 12) = 4,8, p < 0,05$), миндалине ($F(4, 11) = 5,4, p < 0,05$). Во всех исследованных областях мозга удалось обнаружить повышение экспрессии IBA1 в группе «Аβ», по сравнению с контрольной группой. Более того, изменения морфологии микроглии, связанные с активацией, явно присутствовали в группе, получавшей АβO25-35. Следует отметить, что уровни IBA1 были относительно высокими в контрольной группе, вероятно, из-за повреждения ткани головного мозга, вызванного внутрижелудочковой инъекцией. Рапамицин и трегалоза по отдельности или в комбинации заметно ослабляли активацию микроглии.

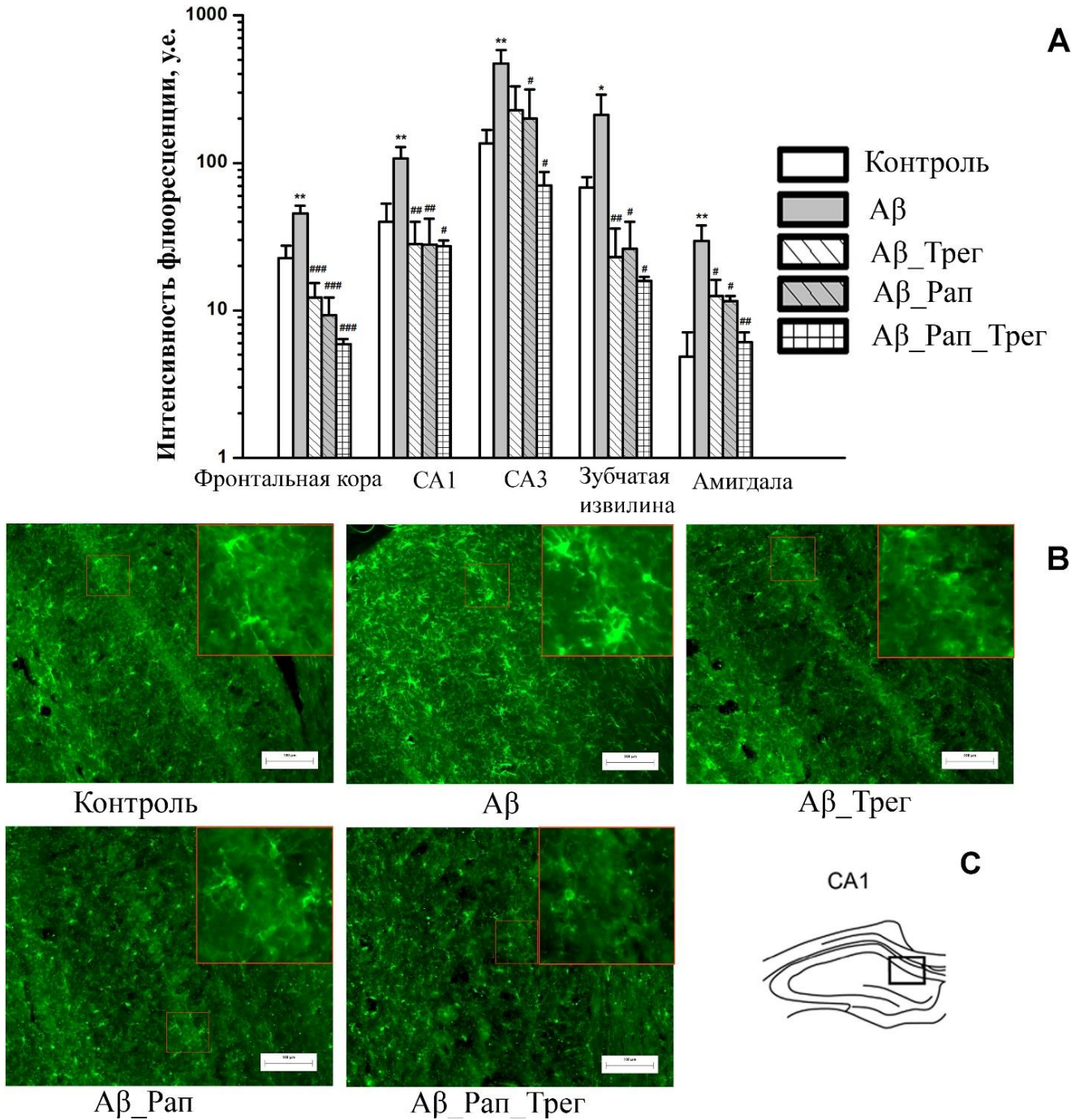


Рисунок 16. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации на экспрессию IBA1. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. $N=3-4$ в группе. На микрофотографиях (В) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против IBA1 в зоне CA1 гиппокампа. Увеличение $200\times$; шкала $100\ \mu\text{m}$. Прямоугольник в (С) указывает область, показанную в (В). Статистически значимые различия: * $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по сравнению с группой «Aβ».

Анализ плотности нейронов, окрашенных по Ниссля, на нейротоксической модели БА
после введения рапамицина и трегалозы

Плотность нейронов измерялась как площадь, занимаемая окрашенными по Ниссля клетками во фронтальной коре, гиппокампе и миндалине (Рис. 17). Экспериментальные группы достоверно различались по параметру только в зоне СА1 гиппокампа ($F(4, 14) = 3,71, p < 0,05$). Введение А β О25-35 приводило к достоверному снижению плотности нейронов в зоне СА1 по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$), в то время как все другие группы достоверно не отличались от контроля. Следовательно, индукторы аутофагии предотвращали индуцированную А β О25-35 гибель нейронов в области СА1.

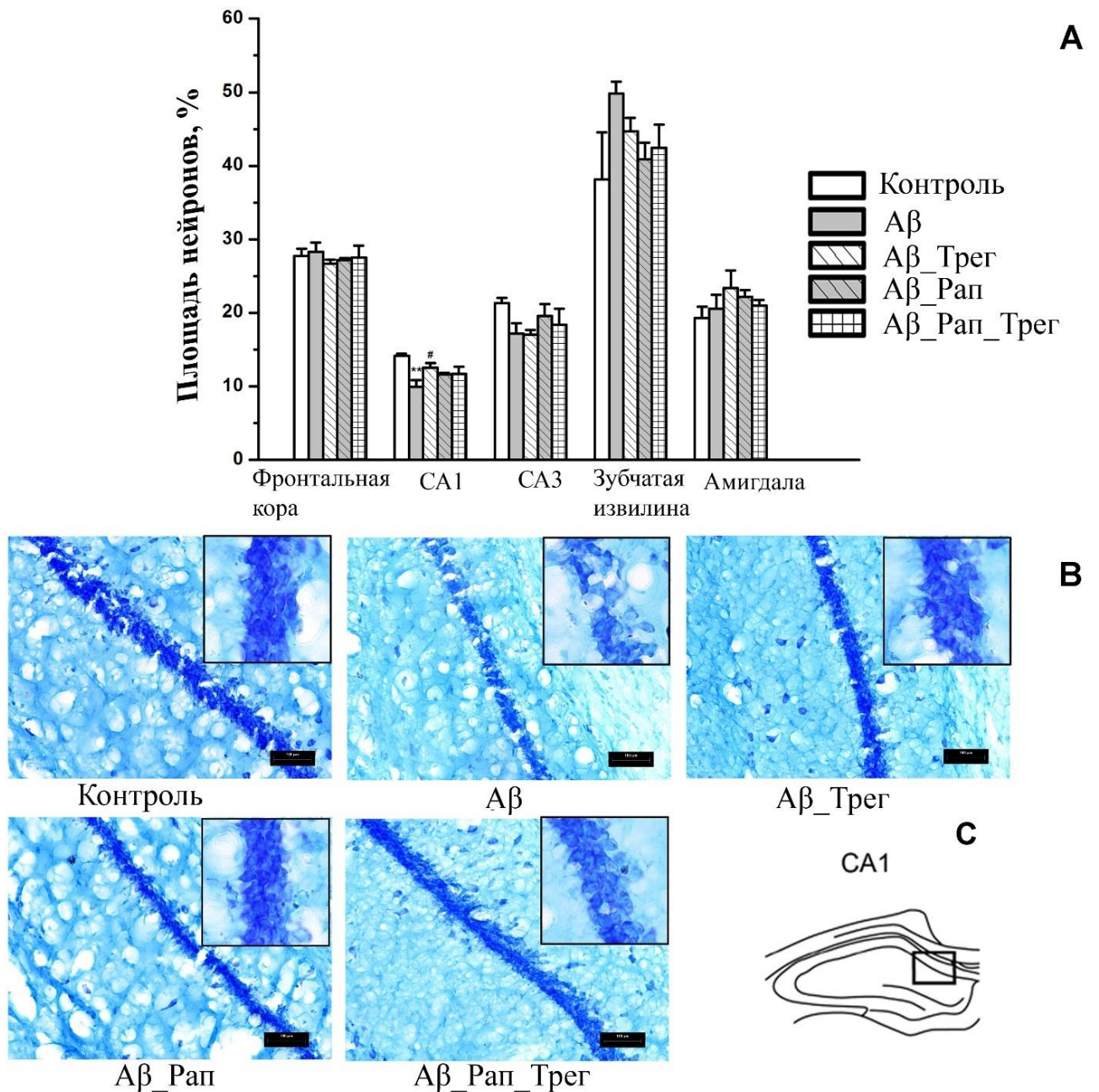


Рисунок 17. Влияние рапамицина, трегалозы, 3-метиладенина или их комбинации на площадь нейронов, окрашенных по Нисслю, в головном мозге мышей на Aβ-индуцированной модели БА. Данные выражены как среднее \pm ошибка среднего, полученные в независимой группе животных ($n = 3-5$ на группу). В: Пирамидные нейроны, окрашенные по Нисслю, в зоне CA1 гиппокампа. Увеличение $200\times$; шкала $100\ \mu\text{m}$. Прямоугольник в (C) указывает область, показанную в (B). Статистически значимые различия: $** p < 0,01$ по сравнению с группой «Контроль»; $\# p < 0,05$ по сравнению с группой «Aβ».

3.2.3. Анализ активности аутофагии на нейротоксической модели БА после введения рапамицина и трегалозы

Экспрессия LC3-II достоверно различалась между экспериментальными группами во всех исследованных структурах мозга: фронтальной коре ($F(6, 22) = 9,8, p < 0,001$), зоне СА1 гиппокампа ($F(6, 21) = 10,9, p < 0,001$), зоне СА3 гиппокампа ($F(6, 21) = 9,7, p < 0,001$), зубчатой извилине гиппокампа ($F(6, 21) = 10,3, p < 0,001$) и миндалине ($F(6, 17) = 6,1, p < 0,01$). Значения экспрессии LC3-II были выше в группе, получавшей А β , по сравнению с контрольной группой, получавшей стерильную воду, однако эти различия не были достоверными (Рис. 18). Наблюдалась тенденция в СА1 зоне гиппокампа ($p = 0,07$), СА3 зоне ($p = 0,18$), в зубчатой извилине ($p = 0,056$). В то же время, после лечения трегалозой наблюдалось значительное увеличение экспрессии LC3-II по сравнению с контролем во фронтальной коре и гиппокампе. Увеличение флуоресценции LC3-II после использования трегалозы, по сравнению с группой А β , было значительно выше, во фронтальной коре, зоне СА3 гиппокампа. Совместное применение рапамицина и трегалозы значительно увеличило уровень экспрессии LC3-II по сравнению как с контрольной группой, так и с группой А β , во фронтальной коре, миндалине, зоне СА1 и зубчатой извилине гиппокампа. Эффект совместного применения рапамицина и трегалозы на экспрессию LC3-II был выше, чем эффекты трегалозы и рапамицина в случае их изолированного применения в зубчатой извилине и миндалине. Следовательно, эти данные свидетельствуют об аддитивной стимуляции аутофагии этими соединениями в определенных структурах мозга в А β -индуцированной модели БА у мышей. Следует отметить, что введение 3-МА заметно ингибировало LC3-II флуоресценцию во всех исследованных областях мозга.

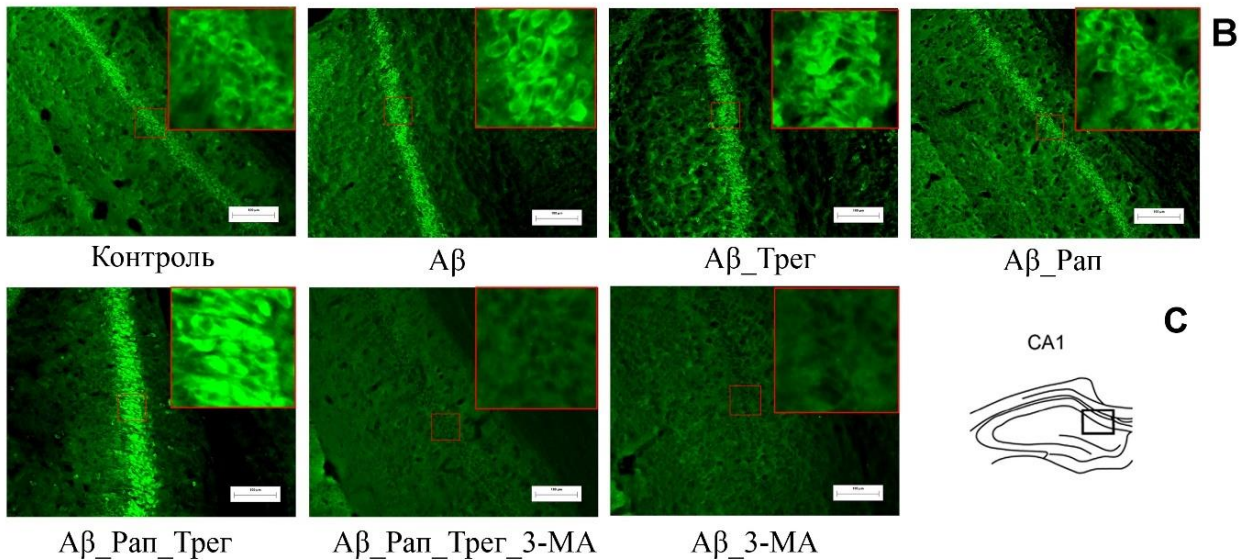
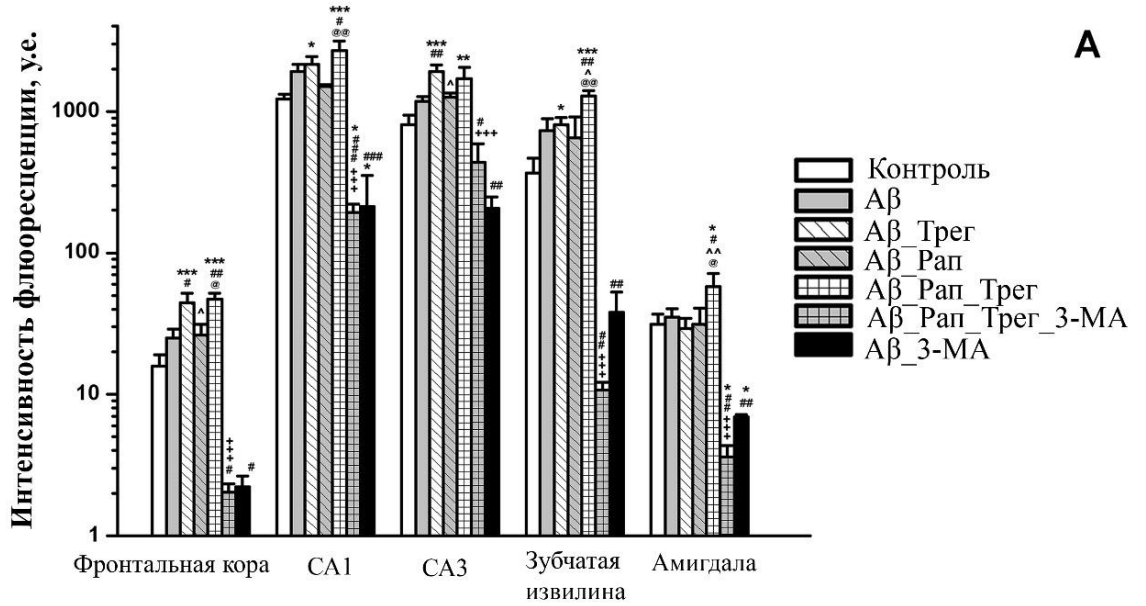


Рисунок 18. Влияние рапамицина, трегалозы, 3-метиладенина или их комбинации на активность аутофагии. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. $N=3-6$ в группе. На микрофотографиях (В) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против маркера LC3-II в зоне CA1 гиппокампа. Увеличение 200 \times ; шкала 100 μ м. Прямоугольник в (С) указывает область, показанную в (В). Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «Контроль»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с группой «A β »; ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$ по сравнению с группой «A β _Трег»; @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,01$ по сравнению с группой «A β _Рап»; +++ $p < 0,001$ по сравнению с группой «A β _Рап_Трег».

Анализ экспрессии генов, связанных с аутофагией (*Atg8*, *Becn1*, *Park2*)
после введения рапамицина и трегалозы

Анализ уровней мРНК генов-мишеней (*Atg8*, *Becn1* и *Park2*) проводили в гиппокампе мышей (Рис. 19). Согласно критерию Краскела-Уоллиса, обнаружено влияние фактора группы на уровень экспрессии мРНК гена *Atg8* ($H(4, N = 34) = 12,03, p < 0,05$). Апостериорный тест по Тьюки выявил увеличение экспрессии мРНК гена *Atg8* в группе «А β _Трег» по сравнению с группой «Контроль» ($p < 0,05$) и по сравнению с группой «А β » ($p < 0,05$). Различий между группами «А β _Рап_Трег» и группами с монотерапией не наблюдалось. Согласно критерию Краскела-Уоллиса, не удалось обнаружить межгрупповых различий в уровне экспрессии мРНК гена *Becn1* ($H(4, N = 34) = 8,68, p = 0,07$). Экспериментальные группы достоверно различались по уровням мРНК гена *Park2* ($F(4,29) = 10,68, p < 0,001$). Апостериорный тест по Тьюки выявил, что этот параметр был значительно выше у группы «А β _Трег» по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) или группой А β ($p < 0,001$), а также с группой «А β _Рап» ($p < 0,05$). Мыши группы из группы «А β _Рап_Трег» не имели более высоких уровней мРНК *Park2* по сравнению с контролем ($p > 0,05$) или группой А β ($p > 0,05$).

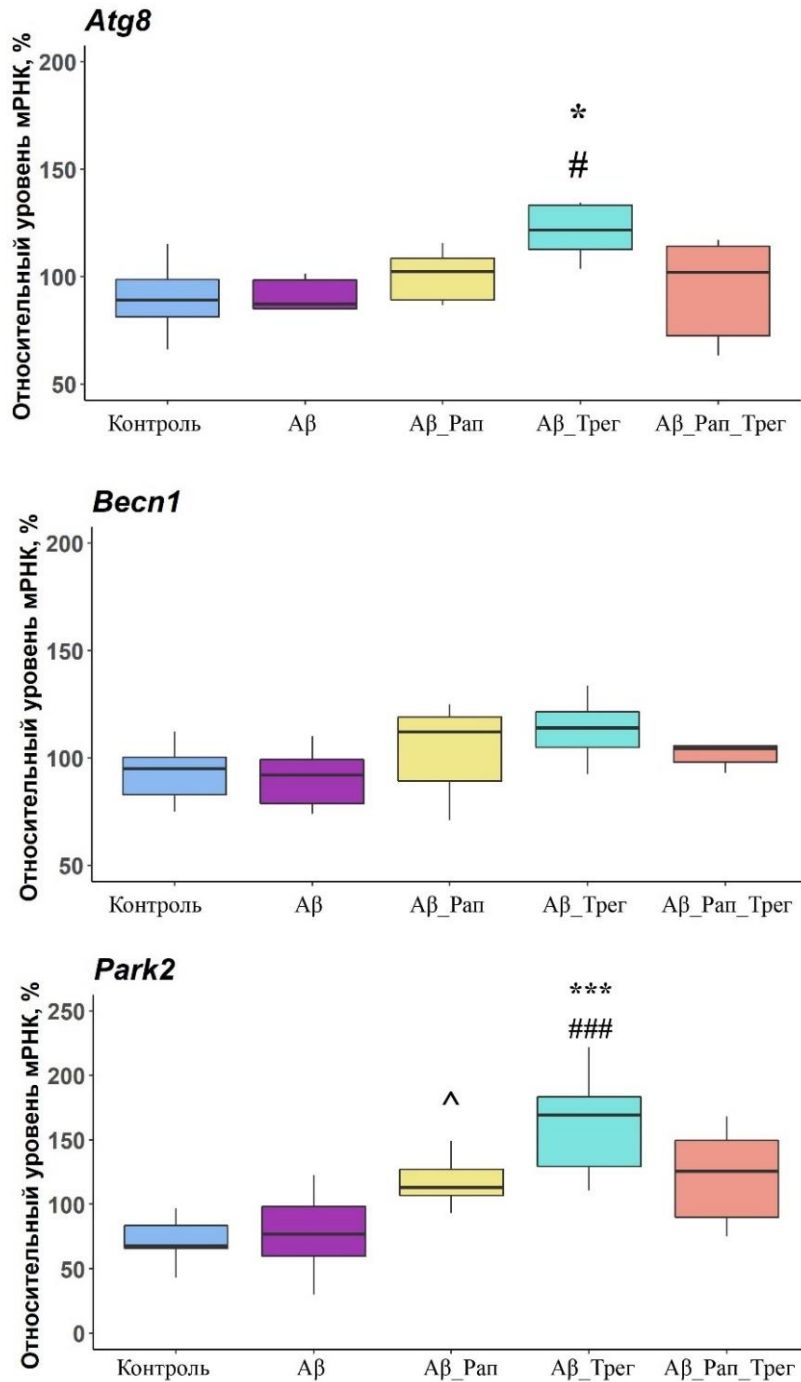


Рисунок 19. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации на уровни мРНК генов, связанных с аутофагией *Atg8* (А), *Becn1* (В) и *Park2* (С) в гиппокампе мышей на Аβ-индуцированной модели БА. Данные представлены в виде коробчатых диаграмм с первым (Q1 или 25-й процентиль) и третьим квантилями (Q3 или 75-й процентиль), медианой и усами значений, полученных в независимой группе животных (n = 6-9 на группу). Статистически значимые различия: * p < 0,05, *** p < 0,001 по сравнению «Контроль»; # p < 0,05, ### p < 0,001 по сравнению с группой «Аβ»; ^ p < 0,05, по сравнению с «Аβ_Трег».

3.3. Влияние цефалоспоринового антибиотика цефтриаксона на когнитивные дефициты, накопление А β , показатели нейровоспаления, плотность нейронов у мышей с центральным введением А β О25-35 в боковые желудочки мозга

3.3.1. Анализ поведения мышей на нейротоксической модели БА после введения цефтриаксона

В тесте «Открытое поле» было выявлено влияние введения А β О25-35 ($F(1,37) = 4,4$, $p < 0,05$) на локомоцию (пройденное расстояние). Межгрупповых различий в *post hoc* тесте по Тьюки не было выявлено. Эффекты лечения Цеф или взаимодействия между факторами были незначительными.

Тест 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. Латентное время перехода в темное помещение во время дня обучения (до удара эл. током) достоверно не различалось между экспериментальными группами. Т-критерий Стьюдента для зависимых переменных выявил достоверное увеличение латентного времени перехода в группах «Раст_Физ» ($t(4) = -2,89$, $p < 0,05$), «Раст_Цеф» ($t(4) = -3,23$, $p < 0,05$) и «А β _Цеф» ($t(5) = -3,79$, $p < 0,05$), но не в группе «А β _Физ» ($t(4) = -1,38$, $p > 0,05$). Это свидетельствует о том, что в контрольных группах («Раст_Физ» и «Раст_Цеф») сформировалась ассоциация между контекстом экспериментальной установки и опасностью темного отсека. В группе с введением амилоида («А β _Физ») фиксировалось нарушение ассоциативной памяти, которое было восстановлено при введении Цеф в группе «А β _Цеф».

Т-образный лабиринт. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил достоверное влияние фактора лечения Цеф ($F(1,34) = 5,2$, $p < 0,05$), но не фактора введения А β О25-35 ($F(1,34) < 1$) или взаимодействия между факторами ($F(1,34) < 1$) на процент правильных выборов в Т-образном лабиринте по протоколу спонтанных чередований (Рис. 20F). Процент правильных выборов в группе «А β _Цеф» был выше, чем в группе «А β _Физ» ($p < 0,05$).

Влияние цефтриаксона на когнитивные функции у мышей с введением А β О25-35 в системе **Intellicage**.

Условная реакция предпочтения места. В данном тесте наблюдалось значительное влияние фактора обучения (повторные измерения) ($F(4,104) = 76,03$, $p < 0,001$) и его взаимодействия с фактором введения А β О25-35 ($F(4,104) = 7,29$, $p < 0,001$) на процент правильных посещений (Рис. 20A). Все экспериментальные группы продемонстрировали достоверное увеличение процента правильных посещений на 2–5-й день тестирования по сравнению с первым днем (периодом обучения) теста. Апостериорный LSD-тест показал, что в первый день теста, процент

правильных посещений был существенно снижен в группе «Аβ_Физ» по сравнению с контрольными мышами из группы «Раст_Физ» ($p < 0,01$), что указывает на нарушения пространственной памяти и обучения у мышей, подвергшихся нейротоксическому воздействию АβO25–35, в то время как у мышей группы «Аβ_Цеф» не наблюдалось значительного снижения параметра по сравнению с группами, не получавшими инъекции АβO25–35. Однако в следующие дни, процент правильных посещений увеличился у мышей из группы «Аβ_Физ» до уровня мышей, получавших воду. Наиболее значительная разница в процентном отношении правильных посещений между мышами из группы «Аβ_Физ» и мышами из группы «Раст_Физ» была отмечена в течение периода 3–6 часов в первый день (Рис. 20В). Мыши из группы «Аβ_Цеф» не показали значительного снижения процента правильных посещений по сравнению с группами, которые не получали инъекции АβO25–35 в последующие дни (фактор обучения (повторные измерения) ($F(3,75) = 7,29, p < 0,001$), введение АβO25–35 ($F(1,25) = 9,2, p < 0,01$).

Переучивание условной реакции предпочтения места. В тесте на переучивание наблюдалось значительное влияние фактора обучения (повторные измерения) ($F(4,104) = 33,83, p < 0,001$) на процент правильных посещений, а также на процент неправильных посещений ($F(4,104) = 33,0, p < 0,001$), при этом влияние других факторов или их взаимодействие было незначительным. Все экспериментальные группы продемонстрировали значительное увеличение процента правильных посещений (Рис. 20С) и одновременно значительное снижение процента неправильных посещений (данные не показаны) на 2–5-й день тестирования по сравнению с первым днем (период обучения) этой фазы. Достоверных межгрупповых различий не обнаружено. Никаких межгрупповых различий не наблюдалось в первый день (фактор обучения (повторные измерения) ($F(3,75) = 10,71, p < 0,001$) для процента правильных посещений и фактор обучения (повторные измерения) ($F(3,75) = 15,79, p < 0,001$) для процента неправильных посещений; данные не показаны). Таким образом, способность к переучиванию условной реакции наблюдалась во всех исследуемых группах. Введение АβO25–35 или Цеф не оказали значительного влияния на эту функцию.

Тест условного избегания. Аналогичным образом, в тесте условного избегания наблюдалось значительное влияние фактора обучения (повторные измерения) ($F(3,78) = 624,2, p < 0,001$) на процент неправильных посещений, в то время как влияние других факторов или их взаимодействие было незначительным. Все экспериментальные группы с первого дня обучения продемонстрировали значительное снижение процента неправильных посещений угла, который на предыдущей фазе (в тесте переучивания условной реакции предпочтения места) был признан правильным (Рис. 20D) и мышей за его посещение не наказывали. На 2–3 дни условного теста избегания во всех группах наблюдалось дальнейшее снижение процента неправильных посещений по сравнению с первым днем тренировки. Таким образом, способность к обучению в тесте

условного избегания наблюдалась во всех исследуемых группах. Введение АβO25–35 или Цеф не оказали значительного влияния на эту функцию.

Тест угашения условного избегания. Тест угашения условного избегания выявил значительное влияние фактора обучения (повторные измерения) ($F(5, 130) = 26,1, p < 0,001$) и введения АβO25–35 ($F(1,26) = 10,55, p < 0,01$) на процент посещений угла, который был признан неправильным во время теста условного избегания, в то время как влияние других факторов или их взаимодействие было незначительным. Все экспериментальные группы продемонстрировали постепенное увеличение процента посещений в тесте угашения условного избегания (Рис. 20D). Мыши из группы «Раст_Физ» или «Раст_Цеф» показали повышенный процент посещений со второго дня теста угашения условного избегания по сравнению с последним днем теста условного избегания. Однако у мышей, получавших АβO25–35, наблюдалось замедленное угасание обучения избегания. Мыши группы «Аβ_Физ» продемонстрировали значительное увеличение процента посещений с четвертого дня, тогда как мыши группы «Аβ_Цеф» с пятого дня теста угашения условного избегания. Примечательно, что значения параметра в группе «Аβ_Цеф» были значительно ниже, чем в группе «Раст_Физ» или «Раст_Цеф» во все дни теста угашения условного избегания.

Тест на патрулирование. Тест на патрулирование также выявил значительный эффект фактора обучения (повторные измерения) на процент правильных посещений ($F(2,52) = 21,1, p < 0,001$), в то время как влияние других факторов или их взаимодействие было незначительным. Согласно апостериорному тесту LSD, все экспериментальные группы продемонстрировали значительное увеличение процента правильных посещений на третий день тестирования по сравнению с первым днем теста. Все группы показали значительно повышенный уровень правильных посещений по сравнению с уровнем вероятности (25%) со второго дня теста поведения патрулирования (Рис. 20E). Таким образом, во всех исследуемых группах рабочая память не была нарушена. Введение АβO25–35 или Цеф не оказали значительного влияния на эту функцию. Однако следует отметить, что группы, обработанные АβO25–35, существенно не различались по проценту правильных посещений по сравнению с уровнем вероятности в первый день теста патрулирования, в то время как группы, получавшие воду, значительно увеличили уровень правильных ответов по сравнению с уровнем вероятности в первый день теста. Это может указывать на задержку усвоения нового правила в группах, получавших АβO25–35.

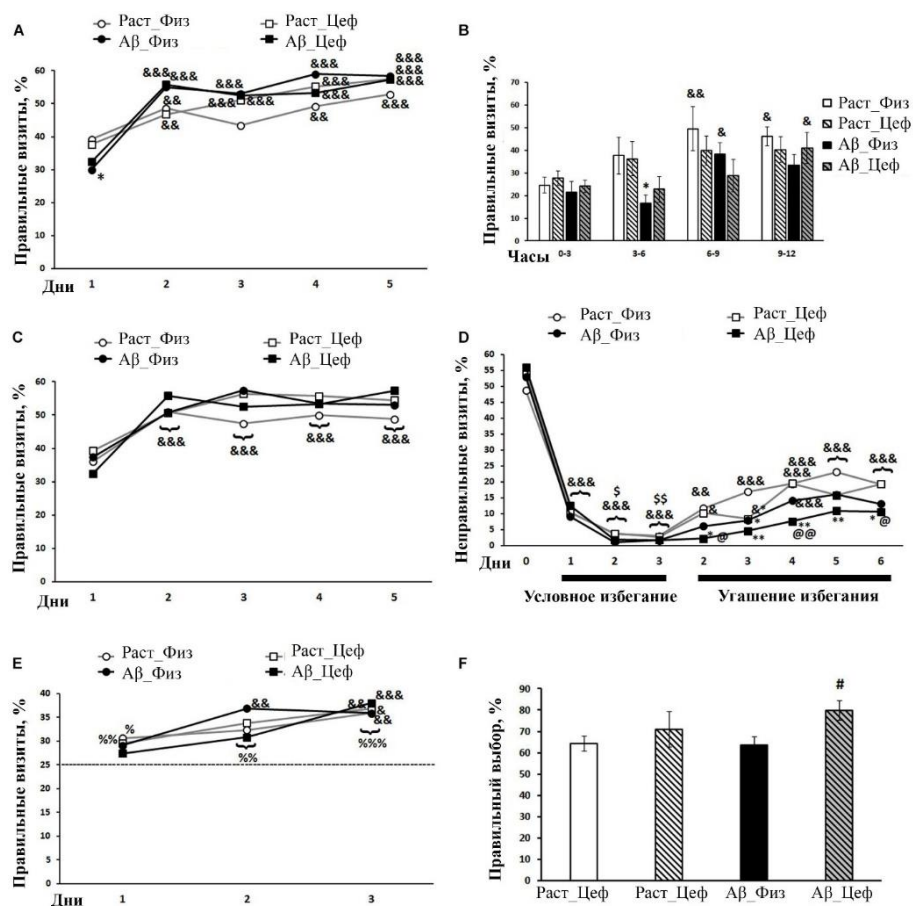


Рисунок 20. Влияние введения Цеф и AβO25–35 на когнитивный профиль в тесте условной реакции предпочтения места (А, В), переучивания условной реакции предпочтения места (С), тесте условного избегания и угашения условного избегания (D), тесте на патрулирование (Е) в IntelliCAge, и тесте спонтанных чередований в Т-образном лабиринте (F) на мышах. Динамика предпочтения места в Intelliscage оценивалась в течение всего периода теста с суммированием значений ежедневно (А) или в течение первого дня этой фазы теста со значениями, объединенными в течение 3 часов (В). Данные выражены в виде средних значений (А, С – Е) или средних \pm ошибка средних (В, F) значений, полученных в независимой группе животных ($n = 7-8$ на группу). Статистически значимые различия: & $p < 0,05$, && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ по сравнению со значениями той же группы в первую временную точку фазы, для условий избегания - по сравнению со значениями той же группы в последний день предыдущей фазы (день 0 на рисунке), для теста угашения избегания - по сравнению со значениями той же группы в последний день предыдущей фазы (день 3 теста условного избегания); \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ по сравнению со значениями, полученными в той же группе в первый день теста на создание условий 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».

3.3.2. Анализ накопления Аβ, плотности нейронов, показателей нейровоспаления на нейротоксической модели БА после введения цефтриаксона

У мышей, подвергшихся центральному введению АβO25-35, накопление Аβ было значительно снижено после терапии Цеф во фронтальной коре и гиппокампе (Табл. 4). Были выявлены достоверные эффекты факторов введения АβO25-35 ($F(1,8) = 62,2, p < 0,001$), лечения Цеф ($F(1,8) = 30,1, p < 0,001$) и их взаимодействия ($F(1,8) = 46,3, p < 0,001$) на уровни Аβ во фронтальной коре у мышей. Точно так же содержание Аβ было значительно увеличено в областях СА1 и СА3 или зубчатой извилине гиппокампа у мышей группы «Аβ_Физ», получавших инъекции АβO25-35, по сравнению с контрольными мышами группы «Раст_Физ», и этот показатель снизился до уровня контрольной группы после терапии Цеф (Табл. 4). В области СА1 гиппокампа значимые эффекты введения АβO25-35 ($F(1,8) = 19,1, p < 0,01$) и взаимодействие между факторами АβO25-35 и лечением Цеф ($F(1,8) = 7,8, p < 0,05$) на уровень Аβ. В области СА3 гиппокампа значимые эффекты введения АβO25-35 ($F(1,8) = 23,2, p < 0,01$), лечения Цеф ($F(1,8) = 9,5, p < 0,05$) и взаимодействия между факторами ($F(1,8) = 11,3, p < 0,01$) на уровень Аβ не обнаружено. Введение АβO25-35 ($F(1,8) = 12,3, p < 0,01$), но не влияние Цеф или взаимодействие факторов, существенно не влияло на содержание Аβ в зубчатой извилине гиппокампа.

Таблица 4 - Влияние введения Цеф и АβO25-35 на накопление Аβ во фронтальной коре, СА1, СА3 зоне гиппокампа и зубчатой извилине у мышей на нейротоксической модели БА

Мозговая структура	Группа				Эффект (<i>F, p</i>)
	<i>Раст_Физ</i>	<i>Раст_Цеф</i>	<i>Аβ_Физ</i>	<i>Аβ_Цеф</i>	
Фронт. кора	24,5±5,3	44,8±17,8	251,6±16,1	61,5±18,7	АβO25-35: $F(1,8) = 62,17$ $p < 0,001$; Цеф: $F(1,8) = 30,13$ $p < 0,001$; АβO25-35 x Цеф: $F(1,8) = 46,29$ $p < 0,001$

					АβO25-35: $F(1,8) = 19,05$ $p < 0,01$; Цеф: $F(1,8) = 3,62$ $p > 0,05$; АβO25-35 x Цеф: $F(1,8) = 7,75$ $p < 0,05$
CA1	52,8±22,4	99±23	428,2±71,4	182,1±70	
					АβO25-35: $F(1,8) = 23,21$ $p < 0,01$; Цеф: $F(1,8) = 9,51$ $p < 0,05$; АβO25-35 x Цеф: $F(1,8) = 11,32$ $p < 0,01$
CA3	71,5±30,6	96,2±40,3	790,5±145,6	223,9±84,4	
					АβO25-35: $F(1,8) = 12,28$ $p < 0,01$; Цеф: $F(1,8) = 2,37$ $p > 0,05$; АβO25-35 x Цеф: $F(1,8) = 2,51$ $p > 0,05$
Зубчатая извилина	100,5±31,5	100,1±19,3	605,9±180,2	295,7±74,9	

Экспрессия IBA1 была значительно повышена во фронтальной коре у мышей группы «Аβ_Физ» по сравнению с группой «Раст_Физ» ($p < 0,001$), в то время как она существенно снизилась до контрольных значений после терапии Цеф ($p < 0,01$). В гиппокампе на экспрессию IBA1 достоверно влияло только введение АβO25–35 в области CA1 ($F(1,8) = 26,3$, $p < 0,001$) или зубчатой извилине ($F(1,8) = 94,4$, $p < 0,001$) но не в области CA3 ($F(1,8) = 2,8$, $p > 0,05$), в то время как эффекты Цеф или взаимодействия факторов были незначительными (Табл. 5).

Таблица 5 - Влияние введения Цеф и АβО25-35 на экспрессию микроглиального маркера IBA1 во фронтальной коре и в гиппокампе у мышей

Мозговая структура	Группа				Эффект (F, p)
	<i>Раст_Физ</i>	<i>Раст_Цеф</i>	<i>Аβ_Физ</i>	<i>Аβ_Цеф</i>	
Фронт. кора	26±2,9	28.8±7,9	101,9±7,8	39.7±6,7	АβО25-35: $F(1,10) = 37,41$ $p < 0,001$;
					Цеф: $F(1,10) = 17,53$ $p < 0,01$;
					АβО25-35 x Цеф: $F(1,10) = 21$ $p < 0,01$
СА1	162,7±52,1	220,1±63,8	485.7±49,4	410,3±27,6	АβО25-35: $F(1,8) = 26,3$ $p < 0,001$;
					Цеф: $F(1,8) < 1$;
					АβО25-35 x Цеф: $F(1,8) = 1,77$ $p > 0,05$
СА3	387,1±79,3	675,6±141,2	837,1±159,3	673,7±143,4	АβО25-35: $F(1,8) = 2,78$ $p > 0,05$;
					Цеф: $F(1,8) < 1$;
					АβО25-35 x Цеф: $F(1,8) = 2,83$ $p > 0,05$
Зубчатая извилина	339,1±172	427,1±89,9	783,9±165,4	1013,9±67,9	АβО25-35: $F(1,8) = 94,38$ $p < 0,001$;
					Цеф: $F(1,8) = 1,45$ $p < 0,05$;
					АβО25-35 x Цеф: $F(1,8) < 1$

Накопление А β также положительно коррелировало с активацией микроглии в области СА1 гиппокампа ($r(12) = 0,82, p < 0,01$) или зубчатой извилине ($r(12) = 0,59, p < 0,05$), но не в области СА3. Положительная корреляция между накоплением А β и экспрессией CD54 была обнаружена в области СА3 гиппокампа ($r(11) = 0,61, p < 0,05$), но не в СА1 или зубчатой извилине.

Экспрессия воспалительного маркера CD54 была значительно увеличена в лобной коре и гиппокампе у мышей группы «А β _Физ» по сравнению с контрольными мышами группы «Раст_Физ», в то время как она существенно снизилась до уровня контрольной группы после терапии Цеф (Рис. 21).

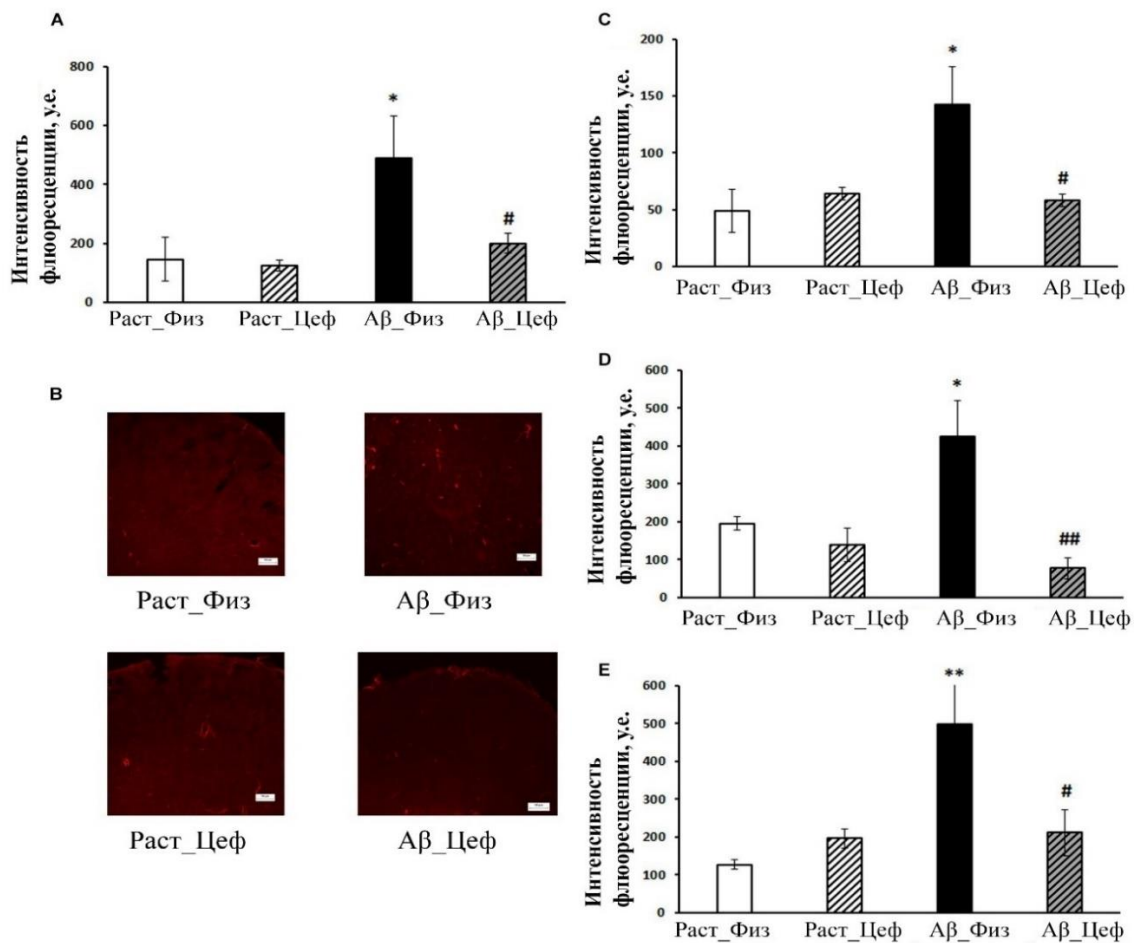


Рисунок 21. Влияние введения Цеф и А β O25–35 на экспрессию воспалительного маркера CD54 во фронтальной коре (А, В) или гиппокампе (С в области СА1; D в области СА3; Е в зубчатой извилине) у мышей. (А, С – Е) - результаты количественного анализа оцифровки изображений (оптическая плотность с поправкой на фон) представлены в виде среднего \pm ошибка среднего. N=3-4 в группе. На микрофотографиях (В) показаны коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенные против CD54 во фронтальной коре. Увеличение - 200 \times , шкала 50 мкм. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с группой «Раст_Физ»; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по сравнению с группой «А β _Физ».

Выявлено достоверное влияние фактора введения АβO25–35 ($F(1,11) = 5,42, p < 0,05$) на уровень CD54 во фронтальной коре. В области CA1 гиппокампа взаимодействие между факторами АβO25–35 и Цеф значительно влияло на экспрессию CD54 ($F(1,10) = 5,5, p < 0,05$). В области CA3 гиппокампа был обнаружен значительный эффект Цеф ($F(1,9) = 9,5, p < 0,05$) на уровень CD54. Введение АβO25–35 ($F(1,9) = 6,95, p < 0,05$), а также взаимодействие между факторами АβO25–35 и Цеф ($F(1,9) = 5,85, p < 0,05$) имели значительное влияние на экспрессию CD54 в зубчатой извилине гиппокампа.

Мы не обнаружили существенных различий в плотности нейронов во фронтальной коре или областях CA1 и CA3 гиппокампа между группами. Ни введение АβO25-35, ни лечение Цеф существенно не повлияли на этот параметр у мышей (Табл. 6).

Таблица 6 - Влияние введения Цеф и АβO25-35 на плотность нейронов (по данным окрашивания по Нисслю) во фронтальной коре и гиппокампе у мышей

Мозговая структура	Группа				Эффект (F, p)
	<i>Раст_Физ</i>	<i>Раст_Цеф</i>	<i>Аβ_Физ</i>	<i>Аβ_Цеф</i>	
Фронт. кора	30.2±1.0	29.8±1.0	29.3±1.9	30.4±1.4	АβO25-35: $F(1,8) < 1$;
					Цеф: $F(1,8) < 1$;
					АβO25-35 x Цеф: $F(1,8) < 1$
CA1	15.6±2.8	13.8±1.7	13.7±1.2	15.2±1.6	АβO25-35: $F(1,8) < 1$;
					Цеф: $F(1,8) < 1$;
					АβO25-35 x Цеф: $F(1,8) < 1$
CA3	14.8±0.8	15.2±0.4	13.9±0.6	14.2±1.0	АβO25-35: $F(1,8) < 1$;
					Цеф: $F(1,8) < 1$;
					АβO25-35 x Цеф: $F(1,8) < 1$

Глава 4. Обсуждение результатов

А β -токсичность способна вызывать снижение когнитивных функций. Это было продемонстрировано при введении различных синтетических типов А β (1-40, 12-28, 25-35). Введение А β 1-40 и А β 12-28 в мозг нарушало сохранение реакции активного избегания в Т-образном лабиринте [154, 155] и в Y-образном лабиринте [156], обучение пассивному избеганию [157] и обучение с пищевым подкреплением у крыс в Y-образном лабиринте [156, 158]. Введение А β О25-35 перед обучением вызывало дозозависимое нарушение рабочей памяти в тесте спонтанного чередования в Y-образном лабиринте и нарушение удержания в обучении в тесте пассивного избегания [159]. Введение А β О25-35 крысам вызывало нарушение пространственной рабочей памяти в радиальном лабиринте с 8 рукавами [160, 161]. Введение агрегированного А β О25-35 в боковые желудочки головного мозга крыс вызывало нарушение памяти в водном лабиринте [162]. Нарушения кратковременной пространственной памяти в водном лабиринте Морриса были продемонстрированы у крыс после билатеральных инъекций А β О25-35 в зоны СА1-СА3 гиппокампа [163]. Как видно из наших результатов, обе модели показали примерно одинаковый уровень дефицита долговременной ассоциативной памяти в тесте пассивного избегания. В то же время введение А β О25-35 не влияло на общую двигательную и исследовательскую активность, а также на показатели эмоциональности и тревожности мышей, выявленные в тесте «Открытое поле».

Следует отметить, что ранние проявления когнитивных нарушений различаются в разных исследованиях. Так, введение фрагментов А β в боковые желудочки головного мозга приводит к амнезии, которая проявляется, начиная с 4-го дня после операции [164], и сохраняется как минимум до 180-го дня после введения [161]. Хотя в вышеупомянутых исследованиях было показано нарушение кратковременной, а не долговременной памяти, в нашем исследовании нарушение долговременной памяти наблюдалось через 1 месяц, что согласуется с другими публикациями [165-167]. В то же время в большинстве цитируемых работ поведение данной формы изучалось лишь один раз, и почти ни в одной из них не сообщалось о временном развитии когнитивных нарушений после введения А β .

Инъекции А β в различные структуры лимбической системы (миндалевидное тело, гиппокамп, маммилярные тела, перегородку, хвостатое тело) вызывали сопоставимое увеличение латентного периода в тесте активного избегания удара током.[154]. В качестве контроля вводили инъекцию в таламус, где увеличения латентного времени не наблюдалось. В нашем исследовании внутригиппокампальные и внутрижелудочковые инъекции не различались. Очевидно, ликвор омывает практически все лимбические структуры и может распределять А β .

Ухудшение памяти может различаться в зависимости от количества введенного А β . Действительно, при внутривентрикулярном введении нам требовалось в 2 раза меньше количества А β , чтобы вызвать такие же нарушения в задаче пассивного избегания. Это согласуется с предыдущим исследованием [155], в котором инъекция аналога А β (1-28) в гиппокамп (0,61 нмоль) вызывала когнитивные дефициты при гораздо меньших дозах, чем инъекция в боковой желудочек (3,07 нмоль) в задаче активного избегания удара током. В некоторых исследованиях использовалась гораздо меньшая доза А β 1-42, от 10 до 500 пмоль на мышшь в задачах на пространственную рабочую или опознавательную память [168, 169].

В экспериментальных группах с введением олигомеров амилоида было обнаружено значительное увеличение экспрессии амилоида по сравнению с группами, которым вводили растворитель. Однако при исследовании накопления амилоида в субструктурах, удалось выявить интересный феномен. Во фронтальной коре накопление амилоида в экспериментальных группах с введением амилоида было более выраженным, чем в гиппокампе, даже при введении амилоида непосредственно в гиппокамп. При введении непосредственно в желудочки, накопление амилоида в зубчатой извилине гиппокампа наблюдалось значительно меньше, чем в группе с введением амилоида в гиппокамп. Это согласуется с данными о распространении амилоидных бляшек у пациентов с БА с течением времени. Неокортекс всегда является первой областью, в которой начинают откладываться отложения А β [170]. Таким образом, можно предположить, что эта область имеет наибольшую восприимчивость к отложению А β . После этого все регионы, вовлекаясь в β -амилоидоз в фазах 2, 3, 4 и 5 получают афферентные импульсы от ранее пораженных областей. При этом отложения А β во всем мозге расширяются в антероградном направлении из областей, уже демонстрирующих отложения А β , в области, получающие на вход сигналы из этих регионов. Поскольку разные области мозга (например, миндалевидное тело и ядра моста) получают на вход сигналы от одной А β -содержащей области (например, неокортекса), но вовлекаются в β -амилоидоз на разных фазах (например, миндалина в А β -фазе 2, а ядра моста в А β -фазе 5) можно сделать вывод, что различная чувствительность к отложению А β играет дополнительную роль в определении того, когда данная область вовлекается в β -амилоидоз. Более высокая чувствительность амилоида к фронтальной коре не сопровождалась снижением плотности нейронов в этой области, что может свидетельствовать о ранних признаках амилоидоза, когда количество амилоида недостаточно для гибели нейронов, но достаточно, чтобы вызывать нейровоспаление.

Характер распределения амилоидных депозитов для обеих моделей в нашей работе хорошо согласуется с распределением маркерного белка активации микроглии IBA1, отражающего усиление нейровоспаления в соответствующих областях мозга. Известно, что IBA1 принимает участие в процессах активирования фагоцитарной функции микроглиоцитов, морфологически

проявляющихся в округлении, увеличении размеров тела клетки и укорочении ее отростков. Было показано, что наибольшие уровни белка IBA1, также как и A β , наблюдались в зонах CA1 и CA3 гиппокампа и по своему значению были примерно одинаковыми, при сравнении моделей между собой. Накопление амилоида сопровождается усилением нейровоспаления и активацией микроглии в CA1 зоне гиппокампа и во фронтальной коре.

Следует заметить, что в нашей работе мы не нашли достоверного повышения уровней мРНК гена *Aif1* в тканях коры и гиппокампа, хотя медианы и диапазоны разброса вариант для групп мышей с интрацеребральным введением A β O25-35 были сдвинуты в области более высоких значений, по сравнению с таковыми у интактных животных. При этом в тканях миндалевидного тела, не подвергавшихся прямому воздействию экзогенного A β O25-35, наблюдалось достоверное увеличение экспрессии этого гена на модели с ИЦВ введением A β O25-35. Хорошо известно, что время полу-жизни мРНК внутри клеток очень коротко и составляет всего несколько минут [171], тогда как приблизительные оценки времени полу-жизни молекул клеточного протеина, полученные для 4000–6000 разновидностей белка, показывают 10-1000 часов [172]. За относительно продолжительный диапазон прошедшего времени от введения A β O25-35, паттерны мРНК с возможно высокими уровнями *Aif1* в гиппокампе и фронтальной коре могли восстановиться до низких контрольных значений, тогда как уровни содержания белка IBA1 в микроглии, участвующей в нейровоспалительном ответе в этих субструктурах мозга, остались на высоком уровне. В литературе отмечены случаи отсутствия однонаправленной динамики изменения количества микроглиального маркерного белка IBA1 и уровней мРНК гена *Aif1* при изучении срезов мозга разных областей коры и гиппокампа у пациентов разной степени тяжести БА с использованием методов ИГХ, ПЦР и Вестерн-блоттинга [122]. На отсутствие изменения уровней мРНК гена *Aif1* в височной коре у больных БА указывалось при изучении активации инфламмосомы NLRP3 как важного компонента нейровоспалительного ответа [173]. С другой стороны, на трансгенных мышах с увеличенной экспрессией предшественников A β , было найдено повышение уровней мРНК гена *Aif1* в гиппокампе животных старше 6 месяцев при начале наблюдений от двухмесячного возраста [174, 175]. Это означает, что возраст животного также является важным фактором в проявлении патогенетических признаков БА. Заметим, что возраст мышей в нашем эксперименте был значительно моложе и составлял около 4 месяцев. Тем не менее, точные причины отсутствия достоверного повышения уровней мРНК гена *Aif1* в гиппокампе и фронтальной коре в условиях нашего эксперимента при выраженном увеличении количества микроглиального белка IBA1 в этих структурах в ответ на введение A β O25-35 остаются неизвестными. Возможно, в определенной мере это связано с недостаточной изученностью процессов посттрансляционной модификации белка IBA1, сопряженной с нейровоспалительными реакциями.

В своей работе мы обнаружили достоверное повышение уровней мРНК гена *Lcn2* в гиппокампе мышей, причем, как и в случае с экспрессией гена *Aif1* в миндалине, это отчетливо проявилось в группе с ИЦВ введением АβO25-35, по сравнению с интактными животными. Следует заметить, что в группе с ИГ введением АβO25-35 медиана и диапазон разброса вариант также были сдвинуты в области более высоких значений. Если увеличение количества IBA1 маркирует активацию микроглиальных клеток в процессах нейровоспаления, то увеличение содержания белка липокалина 2 (LCN2) ассоциируется с увеличением вовлечения астроцитов и эпителия хориоидного сплетения в воспалительные процессы, и этот протеин также маркирует наличие нейровоспаления. Известно, что эпителиальные клетки хориоидного сплетения выстилают стенки бокового желудочка, находящегося в контакте с гиппокампом. Возможно, это и объясняет повышение уровней мРНК гена *Lcn2* в гиппокампе при ИЦВ введении АβO25-35. При ИГ введении АβO25-35 реакция повышения генной экспрессии выражена слабее, т.к. источником модуляции экспрессии мРНК этого гена могли выступать только астроциты без участия эпителиальных клеток. Подтверждением наличия более выраженного нейровоспалительного эффекта на ИЦВ модели служит найденное повышение уровня мРНК гена *Lcn2* в гиппокампе и во фронтальной коре именно в группе с ИЦВ введением растворителя (стерильной воды), по сравнению с интактными животными, что также ассоциируется с вкладом эпителия хориоидного сплетения в модификацию уровня экспрессии этого гена. Изменения уровней мРНК гена *Lcn2* в субструктурах мозга при ИЦВ введении стерильной воды, по всей видимости, связано с воспалительной реакцией в ответ на осмотический шок. Наши результаты согласуются с данными на фармакологической модели БА у крыс, когда было показано, что именно при ИЦВ способе введения стерильной воды и АβO25-35 в обоих случаях наблюдалась дегенерация клеток в дорзальном гиппокампе, тогда как при введении физиологического раствора такого не наблюдалось. [176]. Тем не менее, в нашей работе мы наблюдали снижение плотности нейронов во фронтальной коре при ИГ введении растворителя, что согласуется с данными о потере нейронов в коре при введении амилоида [177]. Участие LCN2 в различных механизмах амилоидной токсичности, особенно в нейровоспалении и окислительном стрессе подтверждается и другими исследователями. Так, например, удалось выявить активацию LCN2 во фронтальной коре головного мозга человека, а также положительную корреляцию между ишемическими изменениями белого вещества и сывороточным LCN2. На модели БА у мышей известно увеличение астроцитарного LCN2, активация микроглии, накопление железа и нарушение гематоэнцефалического барьера в гиппокампе [178].

Уровень экспрессии гена *Nrf2* в гиппокампе, миндалине и во фронтальной коре мышей при обоих ИЦВ и ИГ способах введения АβO25-35 и его растворителя не был изменен. Вероятно, в условиях нашего эксперимента регуляция активности NRF2-системы еще не была затронута

токсическим действием Аβ, а была в большей степени связана с посттрансляционными изменениями этого белка и не с модуляцией экспрессии гена *Nrf2*. Как указывалось, транслокация и активация NRF2 осуществляется только после отщепления от него фрагмента KEAP1, проходящая в цитоплазме при участии протеасом [179]. Тогда процессы регуляции протеасомной рестрикции цитоплазматического NRF2 ответственны за регуляцию активности NRF2-системы и в случае условий нашего эксперимента.

Найдено увеличение содержания белка LC3-II во фронтальной коре мышей с ИГ введением АβO25-35, по сравнению с интактными мышами и соответствующей группой растворителя. Это свидетельствует об активации аутофагии в структурах мозга, индуцированной разными способами центрального введения АβO25-35. Такое же повышение содержания белка LC3-II в структурах мозга на анимальной модели БА наблюдалось и в других исследованиях. Например, при изучении фармакологической модели БА, вызванной центральным введением АβO25-35, наблюдалось почти трёхкратное увеличение экспрессии LC3-II в лобной коре, тогда как антибиотик цефтриаксон значительно снижал скорость аутофагии, что, по-видимому, было связано с его противовоспалительным действием [180].

Уровень экспрессии мРНК гена *Atg8* в гиппокампе, миндалевидном теле и во фронтальной коре мышей через 1 месяц при обоих способах доставки АβO25-35 или его растворителя не был изменен по сравнению с интактными животными. Более того, на относительно старых животных, на анимальной трансгенной модели были получены данные о снижении уровней мРНК гена *Atg8* в 3,1 раза в коре головного мозга 12-месячных мутантных мышей, по сравнению с диким типом [102]. Увеличение уровня белка LC3-I и последующее увеличение уровня белка LC3-II, маркирующего аутофагию, в камбаловидной мышце крыс Wistar после их физической тренировки, несмотря на полное отсутствие изменений в уровнях мРНК *Atg8*, отмечали и другие исследователи [181]. Подобная гетерогенность данных экспрессии мРНК и экспрессии белка также наблюдалась нами и в отношении экспрессии белка IBA1 и экспрессии мРНК *Aif1* в тканях гиппокампа и фронтальной коры при интрацеребральных введениях АβO25-35, о чем указывалось выше. Объяснения подобного феномена могут быть связаны с процессами посттрансляционной модификации белка.

Учитывая данные по усилению аутофагии на основании содержания LC3-II (при отсутствии изменения уровней мРНК гена *Atg8*), следовало ожидать возможное увеличение экспрессии гена *Becn1* в тканях мозга и в нашей работе. С другой стороны, данные, полученные на старых трансгенных мышах и человеческих образцах тканей мозга БА, показывали снижение белка и уровней мРНК гена *Becn1*. Тем не менее, в нашей работе мы не увидели достоверных изменений уровней экспрессии гена *Becn1* в гиппокампе, миндалевидном теле и во фронтальной коре на модельных 4-х месячных мышах через 1 месяц после центральных введений АβO25-35 и его

растворителя. Отсутствие изменений уровней мРНК гена *Becn1* согласуется с таким же отсутствием изменений другого маркера аутофагии - уровней мРНК гена *Atg8*. Таким образом можно заключить, что, несмотря на активацию аутофагии, маркированную по содержанию белка LC3-II (не во всех структурах и не одинаково у разных моделей), проходящий на данной стадии модельный патогенетический процесс уже/еще не оказал модуляционного эффекта на транскрипционную регуляцию изучаемых генов аутофагии у молодых животных.

В нашей работе мы нашли достоверное понижение уровней экспрессии гена *Park2* во фронтальной коре мышей при ИГ введении A β O25-35, по сравнению с интактными животными и тенденцию понижения экспрессии данного гена в этой структуре, по сравнению с ИГ введением растворителя. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [182]. Как и в случае с моделью на крысах, это снижение может быть интерпретировано как факт угнетения митофагии в структурах фронтальной коры, инициированного из гиппокампа. Тем не менее, при изучении экспрессии гена *Park2* в миндалевидном теле был обнаружен противоположный эффект. Причем, отмечалась зависимость выявленного эффекта от другого способа доставки в мозг препаратов: ИЦВ введение A β O25-35 вызывало достоверное повышение уровней мРНК гена *Park2* в тканях амигдалы, по сравнению с ИЦВ введением растворителя, и показывало тенденцию повышения экспрессии данного гена в этой структуре мозга, по сравнению с интактными животными. Этот факт также не противоречит тому, что ИЦВ введение A β O25-35 обладает менее выраженным токсическим действием на митофагию и способствует ее активации в некоторых структурах мозга.

БА характеризуется наличием амилоидных бляшек в головном мозге. Основными компонентами этих бляшек являются пептиды A β 1-40 и A β 1-42. Наряду с наиболее распространенными формами также присутствуют многие более короткие пептиды, образованные ферментативным процессингом. Токсичность зависит от конкретных видов A β , состояния агрегации и структурных особенностей пептидных комплексов [183]. Мономеры и зрелые фибриллы практически нетоксичны или слаботоксичны; основное цитотоксическое действие оказывают промежуточные олигомерные сборки [145, 184]. Последовательность A β 25-35 (GSNKGAIIGLM) является наиболее часто изучаемым фрагментом, поскольку представляет собой биологически активную область более длинных пептидов A β . Примечательно, что пептид A β 25-35 выявляется в головном мозге больных БА [185]. Имеются убедительные доказательства того, что сегмент A β 25-35 играет важную роль в свойствах агрегации и цитотоксичности пептида [186, 187]. Растворимые формы A β 25-35 вызывают синаптическую дисфункцию [188] и взаимодействуют с мембранами, образуя поры и вызывая проницаемость мембран [187, 189]. Модель введения A β O25-35 в боковые желудочки, используемая в нашей работе, характеризуется накоплением A β , повреждением

нейронов гиппокампа и локальным нейровоспалением, которые являются отличительными признаками от ранней до умеренной формы БА [190]. Модель отвечает критериям спорадической формы БА, а не развития редких семейных форм заболевания [191].

Следует отметить, что введение только А β О25-35 приводит к значительному усилению аутофагии в головном мозге, как ранее сообщалось нашими и другими исследовательскими группами [192]. Это явление можно рассматривать как нормальную раннюю реакцию на накопление патологических белков. Была обнаружена тенденция к увеличению экспрессии LC3-II в группе, получавшей А β О25-35, по сравнению с группой с ИЦВ инъекцией стерильной воды в пределах гиппокампа. Такие невыраженные различия между контролем и группой, получавшей А β О25-35, можно объяснить значительной задержкой между введением А β О25-35 и взятием образцов тканей.

Активация аутофагии может быть прототипом терапевтического эффекта и исследована путем оценки изменений mTOR-зависимого и mTOR-независимого путей регуляции аутофагии в областях головного мозга, преимущественно поражаемых при БА, а именно в гиппокампе, лобной коре и миндалевидном теле. Мы оценили возможный аддитивный эффект при активации обоих регуляторных путей и чувствительность эффекта к ингибитору аутофагии 3-МА. mTOR-зависимая стимуляция аутофагии рапамицином хорошо изучена и дает преимущественно положительные терапевтические эффекты [193], хотя и сопровождается некоторыми важными эффектами ингибирования клеточного метаболизма и подавления иммунной системы. Тем не менее, индукция этого пути рапамицином (10 мг/кг) приводила к слабой активации аутофагии, которая существенно не отличалась от таковой в группе, получавшей А β О25-35. По-видимому, со временем происходит некоторое угасание эффекта активации, поскольку в нашем эксперименте между окончанием лечения индукторами аутофагии и взятием образцов тканей для иммуногистохимического анализа прошло 8 дней. Напротив, трегалоза или комбинированное лечение с индукторами аутофагии вызывали пролонгированную активацию аутофагии в головном мозге, влияя на экспрессию ряда генов аутофагии через факторы транскрипции TFEB и FOXO1 [115], тогда как рапамицин действует на посттрансляционный уровень через киназу mTOR.

В настоящей работе трегалоза вызывала более сильную активацию аутофагии, чем рапамицин, в частности, в лобной коре и СА3 зоне гиппокампа. Более высокое увеличение уровней мРНК генов аутофагии (особенно *Park2*) было зарегистрировано в гиппокампе БА-подобных мышей, получавших трегалозу, по сравнению с группой, получавшей рапамицин. Имеются многочисленные сообщения о положительных результатах активации mTOR-независимой аутофагии на повреждение нейронов и нейродегенерацию [91, 194]. По-видимому, эта более высокая эффективность может быть связана с влиянием трегалозы на аутофагию через мишени, отличные

от mTOR. Некоторые мишени с пониженной экспрессией, находящиеся под влиянием классического регулятора mTOR (например, JNK1, комплекс ULK1, AMPK и комплекс Beclin1) могут участвовать в регуляции аутофагии вместе с mTOR или быть независимыми от него [91]. Трегалоза может препятствовать киназной активности AMPK с последующей активацией ULK1 [195]. AMPK оказывает двойное регулирующее действие, влияя как на mTOR-независимые, так и на mTOR-зависимые пути. Другими мишенями трегалозы являются такие регуляторы, как p38, MAPK, FOXO1 [196], многофункциональная киназа АКТ [197] и фосфатазы PPP3 с последующей активацией TFEB [115]. С другой стороны, значение AMPK как мишени не следует переоценивать, поскольку трегалоза способна индуцировать аутофагосомы в клетках, нокаутированных по AMPK $\alpha 1$ [198].

При оценке уровня LC3-II после комбинированного введения индукторов аутофагии мы заметили наиболее мощную активацию аутофагии в зубчатой извилине и миндалевидном теле. Эти данные свидетельствуют об аддитивной стимуляции аутофагии на нейротоксической модели БА. Такое воздействие сильной активации аутофагии может привести к неожиданным результатам, поскольку терапевтическая польза репаративной аутофагии зависит от амплитуды ее индукции, а чрезмерная стимуляция аутофагии может иметь пагубные последствия [199]. В наших экспериментах индукция генов аутофагии при комбинированном лечении была лишь умеренной. Эта индукция была несколько ниже, чем эффект одной трегалозы.

Экспрессии исследованных генов аутофагии была устойчива к воздействию олигомеров амилоида бета, поскольку основная регуляция аутофагии осуществляется на посттрансляционном уровне, при этом литературные данные о транскрипционной модуляции немногочисленны. Мы не обнаружили влияния моделирования БА на экспрессию гена *Atg8* в гиппокампе. Этот результат хорошо согласуется с данными литературы об усилении аутофагии без увеличения транскрипции генов *LC3B*, *mTOR*, *Beclin1*, *catB*, *p62* или *FOXO1* [200]. Влияние на экспрессию генов, связанных с аутофагией, по-видимому, в основном связано с регуляцией транскрипционного фактора EB (TFEB) и *Beclin1* [201]. Трегалоза может повышать активность *Beclin1* [202]. Препарат также вызывает транслокацию TFEB в ядро и стимулирует TFEB-зависимую активацию сети генов CLEAR аутофагии и лизосомного биогенеза, включая гены *LC3B*, *Beclin1*, *p62 (SQSTM1)* и др. [201]. Следовательно, действие трегалозы на экспрессию генов может быть связано с ее влиянием на активность TFEB и последующим влиянием на уровни мРНК *Atg8* и *Becn1* и, возможно, также на экспрессию *Park2*. Тем не менее, некоторые литературные данные опровергают связь TFEB с экспрессией *Becn1* [203]. Согласно нашим данным, уровни мРНК *Atg8* и *Park2* были значительно выше в группе, получавшей трегалозу, чем в группе, подвергавшейся комбинированному лечению рапамицином и трегалозой. Стоит принять во внимание, что рапамицин ингиби-

рует синтез белка и, следовательно, может снизить уровень белка TFEB. Соответственно, рапамицин может модифицировать действие трегалозы на регуляцию TFEB. Следует отметить, что активация аутофагии и ингибирование синтеза белка (аминокислотное голодание) не снижают трансляцию мРНК, кодирующих катаболические белки, участвующие в деградации клеточных белков, в том числе убиквитин-протеасомной системы [204]. Таким образом, лечение только трегалозой, но не комбинированное лечение трегалозой и рапамицином, влияло на экспрессию некоторых генов, связанных с аутофагией (*Atg8* и *Becn1*), предположительно через путь TFEB.

Влияние активации аутофагии на уровни Аβ рассматривается как основа нейропротекторной активности индукторов аутофагии при БА, поскольку считается, что патологическая агрегация и накопление Аβ в ткани головного мозга играют ключевую роль в патогенезе БА [144]. В модели Аβ-индуцированного БА ИЦВ введение АβO25–35 вызывало выраженное накопление Аβ в лобной коре и гиппокампе. При этом все три типа индукции аутофагии эффективно уменьшали отложения Аβ, тогда как 3-МА предотвращал это явление. Результаты означают, что накопление Аβ может быть значительно устранено за счет аутофагии, индуцированной обоими основными регуляторными путями. Это представление согласуется с сообщением о способности аутофагии очищать мозговую ткань от избытка накапливающегося Аβ в модели БА у трансгенных мышей [205]. Ранние стадии БА связаны с нарушением метаболизма Аβ и накоплением олигомеров Аβ — наиболее токсичных форм этого белка, приводящих к синаптическим и нейронным дисфункциям и инициирующим патологический каскад [145]. Более того, помимо цитотоксического характера олигомеров Аβ, недавние сообщения указывают на их роль в инициации агрегации Аβ *in vivo*, поскольку олигомеры Аβ запускают и ускоряют дальнейшее накопление Аβ [183]. Наши выводы подтверждают эту концепцию. Применяемое здесь анти-Аβ-антитело (МОАВ-2, Novus Biologicals) специфично к ранним неагрегированным формам как Аβ1-40 и Аβ1-42, так и к олигомерным и фибриллярным формам Аβ1-42. После центрального введения олигомеров амилоида (АβO25-35) мы выявили внутриклеточное иммуоокрашивание, которое можно рассматривать как начальные этапы амилоидогенеза. Выявленное в нашем исследовании уменьшение отложений Аβ за счет индукции аутофагии, по-видимому, является хорошим объяснением нейропротекторного терапевтического эффекта.

Признаки усиленного воспалительного ответа в головном мозге обнаружены как на трансгенных [206], так и на Аβ-индуцированных [207] моделях БА. При этом экспрессия микроглиального маркера IBA1 оказалась заметно выше в группе, получавшей АβO25-35, в лобной коре, гиппокампе и миндалевидном теле. Следует отметить, что уровни IBA1 были относительно высокими в контрольной группе, получавшей стерильную воду, вероятно, из-за ИЦВ введения. Примечательно, что трегалоза подавляет нейровоспаление, действуя на микроглию [208]. Одним из возможных механизмов этого эффекта является активация репаративной аутофагии в клетках

микроглии, что способствует эффективному удалению этими клетками клеточного дебриса и патологических белковых отложений. Рапамицин также уменьшает нейровоспаление за счет ингибирования mTOR [209] и модуляции провоспалительного ответа микроглии [210]. Наши результаты подтверждают эти выводы, поскольку все три типа лечения индукторами аутофагии приводили к значительному подавлению IBA1 в лобной коре и гиппокампе (CA1 и зубчатая извилина).

Мы оценили нейропротекторные эффекты индукторов аутофагии с помощью оценки плотности нейронов и поведенческого тестирования. Мы измерили плотность нейронов в лобной коре и гиппокампе. Хотя модель БА, используемая в этой работе, соответствует ранним стадиям БА-подобной патологии, некоторые незначительные изменения плотности нейронов все же могут происходить. Действительно, мы зарегистрировали достоверное снижение плотности пирамидных нейронов в зоне CA1 гиппокампа в группе, получавшей A β , тогда как лечение индукторами аутофагии предотвратило это снижение плотности нейронов.

Наряду со снижением накопления A β и нейровоспалительной реакцией в головном мозге, индукторы аутофагии эффективно восстанавливали когнитивную функцию у мышей, получавших A β . В настоящем исследовании память и обучение, связанные со страхом, были значительно снижены у мышей, получавших A β , в соответствии с тестом пассивного избегания, что хорошо согласуется с предыдущими выводами [159]. Поведенческая реакция в тесте пассивного избегания полностью восстанавливалась при всех трех видах воздействия индукторами аутофагии. Учитывая, что восстановленные эффекты были близки к уровню контрольных мышей, нам не удалось обнаружить дополнительного положительного влияния комбинации рапамицин/трегалоза. По той же причине в наших предыдущих экспериментах по аналогичному лечению на модели болезни Паркинсона не удалось выявить аддитивный терапевтический эффект этих индукторов аутофагии при поведенческом тестировании [7].

Повышенная тревожность также считается отличительной чертой БА [211]. Наши данные о повышенной тревожности после введения A β O25–35 (уменьшение времени нахождения в открытых рукавах в тесте крестообразный лабиринт) согласуются с другими данными об усилении тревожности при БА-подобной патологии [212]. При этом индуцированное A β O25–35 усиление тревожности подавлялось комбинированным лечением рапамицина и трегалозы, но их раздельное применение оказалось неэффективным. Луо и его коллеги обнаружили, что тревожность снижается за счет активации аутофагии через рецептор PPAR α в мозге на трансгенной модели БА у мышей [213]. В наших экспериментах также достигалось некоторое ослабление тревожности за счет активации аутофагии при комбинированном введении рапамицина и трегалозы; это явление можно рассматривать как терапевтическое воздействие на эмоциональное поведение. С другой стороны, это явление указывает на преимущество комбинированного применения препаратов перед монотерапией. Мы также исследовали локомоцию с помощью теста «Открытое

поле». Судя по незначительным различиям в локомоции между группами, поведенческие эффекты не зависели от общей двигательной активности мышей, а эффекты препарата в других поведенческих тестах были специфичны для измеряемых параметров.

Перспективными лекарствами для лечения нейродегенеративных заболеваний могут быть молекулы, содержащие в своей структуре бета-лактамно кольцо, такие как цефтриаксон [214]. Модулируя транскрипцию и экспрессию GLT-1, Цеф защищает нейроны от эксайтотоксического повреждения нейронов [66]. Поскольку эксайтотоксичность, опосредованная глутаматом, является одним из основных патогенных факторов, участвующих в различных нейродегенеративных патологиях, включая БА [215], нейропротекторные эффекты Цеф также изучались [214], как на трансгенных моделях БА, моделирующих наследственную форму (линии 3xTg [73] и APPPS1 [216]), так и на крысиной модели преждевременного старения OXYS, моделирующая спорадическую форму БА [8].

В трансгенных моделях на мышах, на поздних стадиях БА-подобной патологии с высокой экспрессией бляшек A β [73, 216] нейропротекторные эффекты Цеф объяснялись ослаблением глутаматергической эксайтотоксичности, индуцированной отложениями A β , в то время как не наблюдалось выраженного влияния на процессинг APP, общие уровни видов A β (за исключением увеличения уровней A β 1-40 у мышей, получавших Цеф) или патологию бляшек [73]. У 5-месячных крыс OXYS, что соответствует ранней стадии БА-подобной патологии, удалось выявить новые мишени Цеф, поскольку он модулирует экспрессию генов, связанных с системой метаболизма A β в головном мозге, а именно влияет на уровни мРНК *Bace1*, *Ace2*, *Mme*, *Ide*, *Ece1* и *Ero* [74]. В данной работе мы проверили, может ли Цеф влиять на накопление A β на ранних стадиях БА-подобной патологии. Действительно, у мышей, подвергшихся центральному введению A β 025–35, отложение A β было значительно снижено после терапии Цеф во фронтальной коре и гиппокампе. Можно предположить, что в моделях поздних стадий БА-подобной патологии с выраженным отложением A β , тех механизмов, которые активируют ферменты деградации A β , недостаточно для значительного очищения от агрегатов A β . В этих случаях полезна активация других механизмов, таких как макроаутофагия, которые отвечают за сегрегацию и уничтожение патологических белковых агрегатов [217]. Следует отметить, что Цеф не индуцирует аутофагию, а оказывает ингибирующее действие [218]. На нейротоксической модели БА у мышей воздействие Цеф снижало повышенный уровень аутофагии в головном мозге [180].

Другим процессом, вносящим значительный вклад в патологию БА, является нейровоспаление. Считается, что он тесно связан с амилоидным каскадом [144]. Следовательно, можно ожидать ослабления A β -индуцированного нейровоспаления из-за снижения накопления A β после лечения Цеф. Действительно, экспрессия провоспалительного маркера CD54 была существенно снижена под действием Цеф как во фронтальной коре, так и в гиппокампе. Однако, экспрессия

маркера активации микроглии IBA1 снижалась в лобной коре после воздействия Цеф, но оставалась повышенной в областях гиппокампа. Кроме того, не было обнаружено значимой корреляции между накоплением A β и нейровоспалительными маркерами в определенных областях гиппокампа. Мы считаем, что имеет место более сложный механизм противовоспалительного действия Цеф. Помимо эффекта, связанного с A β , можно предположить влияние Цеф на другие пути, регулирующие и модулирующие функцию микроглии. Это предположение хорошо согласуется с недавними данными о влиянии Цеф на микроглиальный фагоцитоз глутаматергических синапсов в гиппокампе крыс, которым микроинъекцировали A β 1–40, посредством снижения синаптической продукции комплемента C1q [219].

Наряду с благотворным влиянием на накопление A β и нейровоспалительную реакцию в головном мозге, Цеф эффективно предотвращал когнитивные дефициты у мышей, получавших A β O25–35. Фрагмент A β O25–35, использованный в работе, характеризуется высокой нейротоксичностью за счет высоких агрегационных свойств [184]. Хотя фармакологическая A β -индуцированная модель БА соответствует ранним стадиям прогрессирования БА-подобной патологии, мыши или крысы с A β -индуцированной нейротоксичностью демонстрируют определенные изменения когнитивной функции, включая дефицит рабочей памяти, обучения или пространственной памяти [146]. В настоящем исследовании память и обучение, связанные со страхом, были значительно нарушены у мышей, получавших A β O25–35, в соответствии с тестом пассивного избегания, который хорошо согласуется с предыдущими выводами [159]. Поведенческая реакция в тесте пассивного избегания была полностью восстановлена при лечении Цеф. Однако такого эффекта не было получено в тесте условного избегания, проведенного в системе Intellicage. Это можно объяснить различиями в силе и характере используемых безусловных стимулов. Так, в камере Gemini, безусловным стимулом, который предъявляется животным, является удар электрическим током, сопровождаемый 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. В то же время на показатели рабочей памяти в тесте T-образный лабиринт или Intellicage (патрульное поведение) введение A β O25–35 достоверно не влияло. Однако в группах, получавших A β O25–35, обучение немного замедлялось в первый день теста на патрулирование в Intellicage; у мышей, получавших A β O25–35, наблюдалось замедленное угасание обучения избеганию. Мыши, получавшие Цеф, демонстрировали лучшие результаты при выполнении теста T-образного лабиринта (оценка рабочей памяти), чем группа, получавшая «A β _Физ». В Intellicage у мышей наблюдались различные нарушения, в зависимости от применяемой модели БА [220, 221]. В настоящем исследовании мы выявили дефицит условной реакции предпочтения места в первый день тестирования у мышей, получавших A β O25–35, который был устранен Цеф. Следует

отметить, что тест «Открытое поле» не выявил достоверных различий в показателях локомоции, исследовательской активности или тревожности между контрольной группой и мышами, получавшими АβO25-35, или между группами «Аβ_Физ» и «Аβ_Цеф». Таким образом, наблюдаемое влияние Цеф на когнитивные функции было специфичным и не зависело от общих изменений локомоторного или исследовательского поведения. Благоприятное влияние Цеф на когнитивные функции хорошо согласуется с полученными ранее данными о восстановлении нарушенных когнитивных функций на животных моделях нейродегенеративных заболеваний [8, 73, 222, 223].

Обращаясь к ранее построенной белковой сети, следует ее дополнить уже полученными новыми данными (Рис. 22). Теперь узлы сети представляют собой белки или мРНК соответствующих генов. Активирующие влияния указаны зеленой стрелкой. Ингибирующие влияния указаны красной стрелкой. Узлы аутофагии взаимосвязаны с узлами нейровоспаления через белок NRF2. Он имеет 4 ребра взаимодействий, что выше среднего значения в целом по сети. Также этот узел связан через свои ребра со всеми узлами сети с минимальным количеством промежуточных узлов – 2. Несмотря на то, что нам не удалось найти прямого влияния введения Аβ на экспрессию гена *Nrf2*, стоит отметить, что без этого узла взаимодействие между данными узлами аутофагии и нейровоспаления была бы невозможна при выставленном score 0,4. Таким образом, поиск терапевтических мишеней, стоит проводить среди агентов, способных воздействовать прямо на белок NRF2.

Известно, что рапамицин как ингибитор mTOR тормозит старение клеток *in vitro*, увеличивает продолжительность жизни у некоторых видов и способен повысить уровень белка NRF2 [224]. Фактический механизм, с помощью которого это происходит, полностью не выяснен. Вероятно, это происходит на уровне стабилизации белка, а не увеличения экспрессии гена *Nrf2*, поскольку рапамицин не увеличивает уровни мРНК *Nrf2*, а снижает Keap1 - белка, запускающего деградацию NRF2 [225]. Было показано, что уровни NRF2 снижаются с возрастом, а подавление гена *Nrf2* вызывает преждевременное старение. Мыши с нокаутом гена *Nrf2* имеют высокий уровень провоспалительных цитокинов в тканях и в плазме, а рапамицин способен подавить воспалительный статус этих мышей даже при отсутствии гена *Nrf2* [226]. Это согласуется с нашими данными по воздействию рапамицина на узлы сети, связанные с нейровоспалением. Трегалоза, в свою очередь, повышает экспрессию белка p62 что влечет за собой усиленную ядерную транслокацию NRF2 для стимуляции транскрипции генов-мишеней NRF2, таких как ферменты детоксикации и антиоксидантные молекулы [116]. Повышается дезинтоксикационная способность органов, усиливается активность антиоксидантных ферментов, снижается перекисное окисление липидов, снижается секреция факторов воспаления TNF-α, IL-1β, IL-6. В нашем исследовании, рапамицин и трегалоза влияют на узел нейровоспаления - IBA1. Следовательно, индукторы аутофагии способны воздействовать на биологические процессы, ассоциированные со всей сетью:

митофагия (GO:0000423), старение (GO:0007568), клеточный ответ на азотное голодание (GO:0006995), регуляция метаболизма активных форм кислорода (GO:2000377), клеточный ответ в результате воздействия ионов железа (GO:0010040), реакция на окислительный стресс (GO:0006979), реакция на стресс (GO:0033554) и др. Рапамицин и трегалоза через свои мишени, очевидно, способны воздействовать и на узлы аутофагии. Однако, индукция аутофагии может быть вредной, если нарушен поток аутофагасом и лизосом. Поэтому стимулирование достаточного производства аутофагасом рапамицином и усиление лизосомной функции трегалозой направленных на увеличение аутофагасомного и лизосомального потоков, будут способствовать клиренсу амилоидного белка при БА.

Цеф, в свою очередь, снижает экспрессию воспалительных маркеров CD54, IBA1 на нейротоксической модели БА. Однако, как он влияет на аутофагию, в данном исследовании не изучалось. Из литературных данных известно, что цефтриаксон значительно снижает LC3 II в гиппокампе крыс на модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) [227] и на фармакологической модели БА [180]. Но и на модели ЧМТ, и на модели БА уровень LC3 был изначально повышенным, что свидетельствует об активации аутофагии при развитии данных патологий. Тем не менее, нейропротекторный механизм индуцированного цефтриаксоном ослабления аутофагии остается нерешенным. Дальнейшие исследования, посвященные межбелковым взаимодействиям между аутофагией и воспалением, привели нас к поиску новых терапевтических мишеней. Взаимодействие CD54 и NRF2, отраженное в данной сети известно при хронических воспалительных заболеваниях. Уровень экспрессии NRF2 и CD54 снижается при хронической обструктивной болезни легких, действуя прямо или косвенно на сиртуин 6 (Sirt6) [228]. Sirt6 является членом семейства сиртуинов, NAD-зависимых ферментов и является одним из немногих генов, регулирующих процессы старения. Таким образом, свойства сиртуинов замедлять процессы старения и его противовоспалительное действие делают Sirt6 новой мишенью для лечения БА.

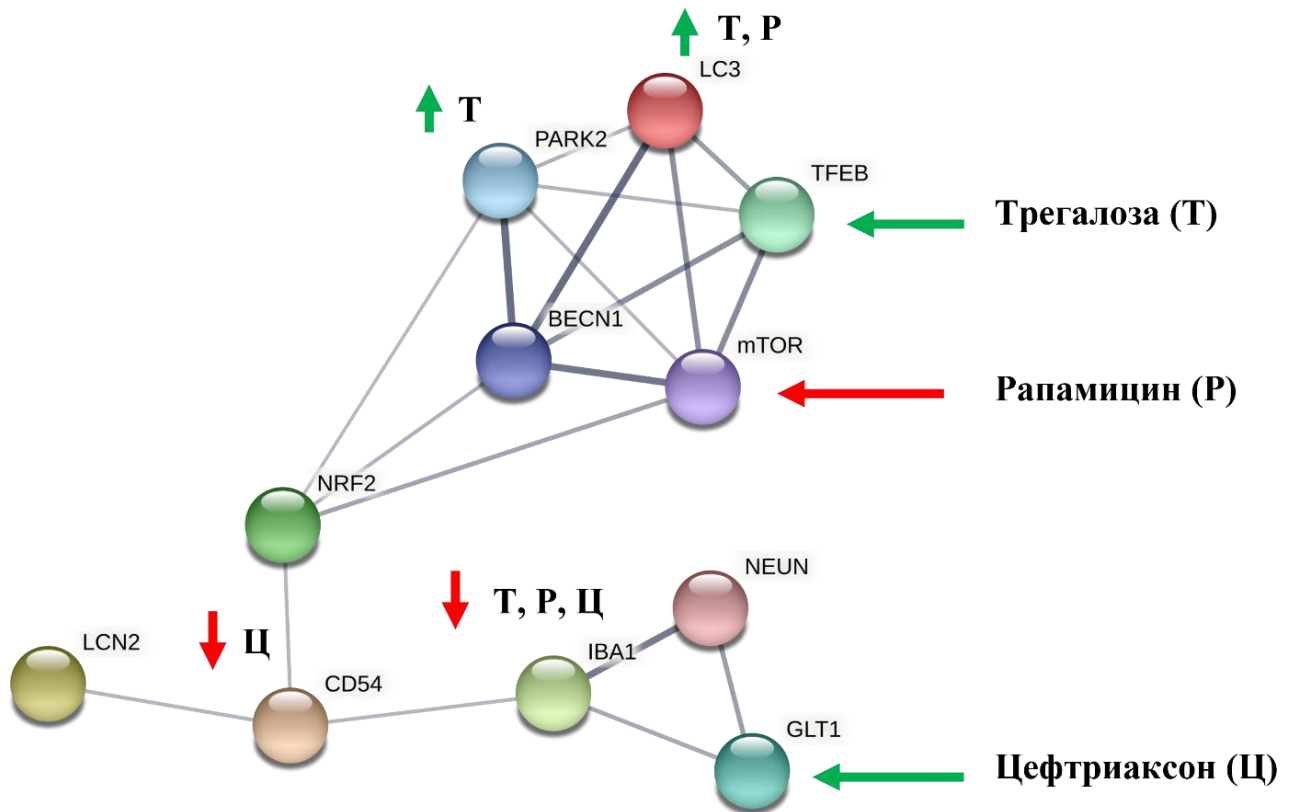


Рисунок 22. Сетевое представление исследованных белков и генов. Узлы сети представляют собой изученные белки или гены. Ребра представляют собой предсказанные функциональные ассоциации. Толщина линии ребер указывает на степень достоверности предсказания взаимодействия: скор от 0,4 до 0,9. Красными стрелками указано ингибирующее влияние. Зелеными стрелками указано активирующее влияние.

Заключение

На нейротоксической модели БА у мышей как ИЦВ (10 мкг), так и ИГ (5 мкг) билатеральное введение олигомеров А β вызывало нарушение когнитивных показателей, сопровождающееся сопоставимым накоплением А β 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 А β O25-35, 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 А β O25-35. Активация mTOR-зависимой аутофагии рапамицином и mTOR-независимой аутофагии трегалозой приводит к снижению накопления А β , 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-лактамно кольцо, в качестве перспективного лечения когнитивных дефицитов на ранних стадиях БА. Показана патогенетически обоснованная коррекция цефтриаксоном когнитивных нарушений, которая характеризуется снижением накопления А β , 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 А β О25-35 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 (CA1 и CA3 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 функции у мышей с введением А β О25-35 в боковые желудочки, снижала накопление А β , активацию микроглии во фронтальной коре и гиппокампе (CA1, CA3 области, зубчатая извилина) мышей. Показан кумулятивный эффект совместной активации аутофагии рапамицином и трегалозой на экспрессию маркера аутофагии LC3-II в зубчатой извилине гиппокампа и миндалевидном комплексе мышей.
3. Цефтриаксон восстанавливал нарушенную внутрижелудочковым введением А β 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 А β во фронтальной коре, CA1 и CA3 областях гиппокампа, снижал экспрессию маркеров воспаления IBA1 во фронтальной коре, CD54 во фронтальной коре, CA1, CA3 областях и в зубчатой извилине гиппокампа.

Список использованной литературы

1. Тихонова, М. А. Нейрофизиологические и молекулярно-генетические механизмы поведенческих нарушений, обусловленных нейродегенеративными изменениями в головном мозге: экспериментальное исследование: дис. ... д-ра. биол. наук: 03.03.01 / Тихонова Мария Александровна. — Новосибирск., 2018. — 357 с.
2. Hardy J. A., Higgins G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis // *Science*. — 1992. — Т. 256. — №. 5054. — С. 184-185.
3. Castellani R. J., Plascencia-Villa G., Perry G. The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: Theory versus observation // *Laboratory Investigation*. — 2019. — Т. 99. — №. 7. — С. 958-970.
4. Brothers H. M., Gosztyla M. L., Robinson S. R. The physiological roles of amyloid- β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease // *Frontiers in aging neuroscience*. — 2018. — С. 118.
5. Espinet C. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a neurotrophic approach // *Current drug targets*. — 2015. — Т. 16. — №. 1. — С. 20-30.
6. Nixon R. A., Yang D. S. Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect // *Neurobiology of disease*. — 2011. — Т. 43. — №. 1. — С. 38-45.
7. Pupyshev A. B. et al. Therapeutic activation of autophagy by combined treatment with rapamycin and trehalose in a mouse MPTP-induced model of Parkinson's disease // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. — 2019. — Т. 177. — С. 1-11.
8. Tikhonova M. A. et al. Neuroprotective effects of ceftriaxone treatment on cognitive and neuronal deficits in a rat model of accelerated senescence // *Behavioural brain research*. — 2017. — Т. 330. — С. 8-16.
9. Schneider J. A. et al. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. — 2009. — Т. 66. — №. 2. — С. 200-208.
10. Javaid, S. F., Giebel, C., Khan, M. A., Hashim, M. J. Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias: rising global burden and forecasted trends // *F1000Research*. — 2021. — V. 10. — No. 425. — P. 425.

11. Язуина Н. А. и др. Эпидемиология болезни Альцгеймера в мире // Неврологический журнал. – 2012. – Т. 17. – №. 5. – С. 32-37.
12. Wu Y. T. et al. The changing prevalence and incidence of dementia over time—current evidence // Nature Reviews Neurology. – 2017. – Т. 13. – №. 6. – С. 327-339.
13. Kövari E. et al. Amyloid deposition is decreasing in aging brains: an autopsy study of 1,599 older people // Neurology. – 2014. – Т. 82. – №. 4. – С. 326-331.
14. Fratiglioni L. et al. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group // Neurology. – 2000. – Т. 54. – №. 11 Suppl 5. – С. S10-5.
15. Kukull W. A. et al. Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study // Archives of neurology. – 2002. – Т. 59. – №. 11. – С. 1737-1746.
16. Miech R. A. et al. Incidence of AD may decline in the early 90s for men, later for women: The Cache County study // Neurology. – 2002. – Т. 58. – №. 2. – С. 209-218.
17. Qiu C., Kivipelto M., Von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention // Dialogues in clinical neuroscience. – 2022.
18. Armstrong R. A. Risk factors for Alzheimer's disease // Folia neuropathologica. – 2019. – Т. 57. – №. 2. – С. 87-105.
19. Montine T. J. et al. National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach // Acta neuropathologica. – 2012. – Т. 123. – №. 1. – С. 1-11.
20. Knopman D. S. et al. Alzheimer disease // Nature reviews Disease primers. – 2021. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-21.
21. Shoji M. et al. Combination assay of CSF tau, A β 1-40 and A β 1-42 (43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease // Journal of the neurological sciences. – 1998. – Т. 158. – №. 2. – С. 134-140.
22. Morley J. E. et al. A physiological role for amyloid- β protein: enhancement of learning and memory // Journal of Alzheimer's disease. – 2010. – Т. 19. – №. 2. – С. 441-449.
23. Puzzo D. et al. Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus // Journal of Neuroscience. – 2008. – Т. 28. – №. 53. – С. 14537-14545.

24. Raymond C. R., Ireland D. R., Abraham W. C. NMDA receptor regulation by amyloid- β does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus // *Brain research*. – 2003. – T. 968. – №. 2. – C. 263-272.
25. Trubetskaya V. V. et al. Administration of aggregated beta-amyloid peptide (25–35) induces changes in long-term potentiation in the hippocampus in vivo // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2003. – T. 33. – №. 2. – C. 95-98.
26. Wu J., Anwyl R., Rowan M. J. β -amyloid-(1–40) increases long-term potentiation in rat hippocampus in vitro // *European journal of pharmacology*. – 1995. – T. 284. – №. 3. – C. R1-R3.
27. Walsh D. M. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo // *Nature*. – 2002. – T. 416. – №. 6880. – C. 535-539.
28. Dougherty J. J., Wu J., Nichols R. A. β -Amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – T. 23. – №. 17. – C. 6740-6747.
29. Kamenetz F. et al. APP processing and synaptic function // *Neuron*. – 2003. – T. 37. – №. 6. – C. 925-937.
30. Yankner B. A., Duffy L. K., Kirschner D. A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides // *Science*. – 1990. – T. 250. – №. 4978. – C. 279-282.
31. Wang C. S., Wurtman R. J., Lee R. K. K. Amyloid precursor protein and membrane phospholipids in primary cortical neurons increase with development, or after exposure to nerve growth factor or A β 1–40 // *Brain research*. – 2000. – T. 865. – №. 2. – C. 157-167.
32. Phinney A. L. et al. Cerebral amyloid induces aberrant axonal sprouting and ectopic terminal formation in amyloid precursor protein transgenic mice // *Journal of Neuroscience*. – 1999. – T. 19. – №. 19. – C. 8552-8559.
33. Plant L. D. et al. The production of amyloid β peptide is a critical requirement for the viability of central neurons // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – T. 23. – №. 13. – C. 5531-5535.
34. Kontush A. et al. Amyloid- β is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2001. – T. 30. – №. 1. – C. 119-128.
35. Zou K. et al. A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage // *Journal of Neuroscience*. – 2002. – T. 22. – №. 12. – C. 4833-4841.

36. Bishop G. M., Robinson S. R. Human A β 1–42 reduces iron-induced toxicity in rat cerebral cortex // *Journal of neuroscience research*. – 2003. – T. 73. – №. 3. – C. 316-323.
37. Nunomura A. et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. – 2001. – T. 60. – №. 8. – C. 759-767.
38. Kontush A., Donarski N., Beisiegel U. Resistance of human cerebrospinal fluid to in vitro oxidation is directly related to its amyloid- β content // *Free radical research*. – 2001. – T. 35. – №. 5. – C. 507-517.
39. Bishop G. M., Robinson S. R. The amyloid paradox: Amyloid- β -metal complexes can be neurotoxic and neuroprotective // *Brain pathology*. – 2004. – T. 14. – №. 4. – C. 448-452.
40. Robinson S. R., Bishop G. M. A β as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease // *Neurobiology of aging*. – 2002. – T. 23. – №. 6. – C. 1051-1072.
41. Krafft G. A., Klein W. L. ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease // *Neuropharmacology*. – 2010. – T. 59. – №. 4-5. – C. 230-242.
42. Ferreira S. T. et al. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2015. – T. 9. – C. 191.
43. Xia M. et al. The binding receptors of A β : an alternative therapeutic target for Alzheimer's disease // *Molecular neurobiology*. – 2016. – T. 53. – №. 1. – C. 455-471.
44. Garwood C. J. et al. astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. – 2017. – T. 43. – №. 4. – C. 281-298.
45. Puzzo D. et al. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines // *Biochemical pharmacology*. – 2014. – T. 88. – №. 4. – C. 450-467.
46. Li C., Ebrahimi A., Schluesener H. Drug pipeline in neurodegeneration based on transgenic mice models of Alzheimer's disease // *Ageing research reviews*. – 2013. – T. 12. – №. 1. – C. 116-140.
47. Panza F. et al. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease // *Nature Reviews Neurology*. – 2019. – T. 15. – №. 2. – C. 73-88.
48. Schneider L. S. A critical review of cholinesterase inhibitors as a treatment modality in Alzheimer's disease // *Dialogues in clinical neuroscience*. – 2022.
49. Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics // *Molecular medicine reports*. – 2019. – T. 20. – №. 2. – C. 1479-1487.

50. Liu K. Y., Howard R. Can we learn lessons from the FDA's approval of aducanumab? // *Nature Reviews Neurology*. – 2021. – Т. 17. – №. 11. – С. 715-722.
51. Li Y. Y., Jones S. J. M. Drug repositioning for personalized medicine // *Genome medicine*. – 2012. – Т. 4. – №. 3. – С. 1-14.
52. Janes M. R., Fruman D. A. Immune regulation by rapamycin: moving beyond T cells // *Science Signaling*. – 2009. – Т. 2. – №. 67. – С. pe25-pe25.
53. Mendelsohn A. R., Larrick J. W. Rapamycin as an antiaging therapeutic?: Targeting mammalian target of rapamycin to treat Hutchinson–Gilford progeria and neurodegenerative diseases // *Rejuvenation research*. – 2011. – Т. 14. – №. 4. – С. 437-441.
54. Spilman P. et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid- β levels in a mouse model of Alzheimer's disease // *PloS one*. – 2010. – Т. 5. – №. 4. – С. e9979.
55. Zhang L. et al. Evaluating the effectiveness of GTM-1, rapamycin, and carbamazepine on autophagy and Alzheimer disease // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2017. – Т. 23. – С. 801.
56. Yu W. H. et al. Macroautophagy—a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease // *The Journal of cell biology*. – 2005. – Т. 171. – №. 1. – С. 87-98.
57. Lee S., Sato Y., Nixon R. A. Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy // *Journal of Neuroscience*. – 2011. – Т. 31. – №. 21. – С. 7817-7830.
58. Хорошина Л. П. Трегалоза-дисахарид, сохраняющий жизнь // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2022. – №. 2. – С. 139-147.
59. Tien N. T. et al. Trehalose alters subcellular trafficking and the metabolism of the Alzheimer-associated amyloid precursor protein // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Т. 291. – №. 20. – С. 10528-10540.
60. Du J. et al. Trehalose rescues Alzheimer's disease phenotypes in APP/PS1 transgenic mice // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2013. – Т. 65. – №. 12. – С. 1753-1756.
61. Lee L. H., Shineman D. W., Fillit H. M. A diverse portfolio of novel drug discovery efforts for Alzheimer's disease: Meeting report from the 11th International Conference on Alzheimer's Drug Discovery, 27-28 September 2010, Jersey City, NJ, USA. – 2010..

62. Sun L. et al. Trehalose targets Nrf2 signal to alleviate d-galactose induced aging and improve behavioral ability // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2020. – Т. 521. – №. 1. – С. 113-119.
63. Krüger U. et al. Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose // *Neurobiology of aging*. – 2012. – Т. 33. – №. 10. – С. 2291-2305.
64. Пупышев А. Б., Короленко Т. А., Тихонова М. А. Терапевтическая мишень торможения нейродегенерации: аутофагия // *Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова*. – 2016. – Т. 66. – №. 5. – С. 515-540.
65. Nau R. et al. Passage of cefotaxime and ceftriaxone into cerebrospinal fluid of patients with uninflamed meninges // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1993. – Т. 37. – №. 7. – С. 1518-1524.
66. Rothstein J. D. et al. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression // *Nature*. – 2005. – Т. 433. – №. 7021. – С. 73-77.
67. Hota S. K. et al. Ceftriaxone rescues hippocampal neurons from excitotoxicity and enhances memory retrieval in chronic hypobaric hypoxia // *Neurobiology of learning and memory*. – 2008. – Т. 89. – №. 4. – С. 522-532.
68. Lipski J. et al. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke // *Neuroscience*. – 2007. – Т. 146. – №. 2. – С. 617-629.
69. Leung T. C. H. et al. Ceftriaxone ameliorates motor deficits and protects dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats // *ACS chemical neuroscience*. – 2012. – Т. 3. – №. 1. – С. 22-30.
70. Stennett B. A. et al. Ceftriaxone reduces alcohol intake in outbred rats while upregulating xCT in the nucleus accumbens core // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2017. – Т. 159. – С. 18-23.
71. LaCrosse A. L. et al. Contrasting the role of xCT and GLT-1 upregulation in the ability of ceftriaxone to attenuate the cue-induced reinstatement of cocaine seeking and normalize AMPA receptor subunit expression // *Journal of Neuroscience*. – 2017. – Т. 37. – №. 24. – С. 5809-5821.
72. Cudkowicz M. E. et al. Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *The Lancet Neurology*. – 2014. – Т. 13. – №. 11. – С. 1083-1091.

73. Zumkehr J. et al. Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of aging*. – 2015. – T. 36. – №. 7. – C. 2260-2271.
74. Tikhonova M. A. et al. Modulation of the expression of genes related to the system of amyloid-beta metabolism in the brain as a novel mechanism of ceftriaxone neuroprotective properties // *BMC neuroscience*. – 2018. – T. 19. – №. 1. – C. 15-28.
75. Gilbert J. G., Levee R. F. Patterns of declining memory // *Journal of Gerontology*. – 1971.
76. Crook T. H., West R. L. Name recall performance across the adult life-span // *British journal of Psychology*. – 1990. – T. 81. – №. 3. – C. 335-349.
77. Drachman D. A., Leavitt J. Memory impairment in the aged: storage versus retrieval deficit // *Journal of Experimental Psychology*. – 1972. – T. 93. – №. 2. – C. 302.
78. Luszcz M. A., Bryan J. Toward understanding age-related memory loss in late adulthood // *Gerontology*. – 1999. – T. 45. – №. 1. – C. 2-9.
79. Morris J. C. Current vision and scoring rules the clinical dementia rating (CDR) // *Neurology*. – 1993. – T. 43. – C. 2412-2414.
80. Farlow, M. R. Alzheimer's disease // *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*. – 2007. – T. 13. – №. 2. – C. 39-68.
81. Howieson D. B. et al. Neurologic function in the optimally healthy oldest old: Neuropsychological evaluation // *Neurology*. – 1993. – T. 43. – №. 10. – C. 1882-1882.
82. Rubin E. H. et al. A prospective study of cognitive function and onset of dementia in cognitively healthy elders // *Archives of neurology*. – 1998. – T. 55. – №. 3. – C. 395-401.
83. Gonnerman L. M. et al. Double dissociation of semantic categories in Alzheimer's disease // *Brain and language*. – 1997. – T. 57. – №. 2. – C. 254-279.
84. Carlesimo G. A., Oscar-Berman M. Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review // *Neuropsychology review*. – 1992. – T. 3. – №. 2. – C. 119-169.
85. Jelicic M., Bonebakker A. E., Bonke B. Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review // *International Psychogeriatrics*. – 1995. – T. 7. – №. 3. – C. 385-392.
86. Hughes R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2004. – T. 28. – №. 5. – C. 497-505.

87. Dudchenko P. A. et al. Animal models of working memory: a review of tasks that might be used in screening drug treatments for the memory impairments found in schizophrenia // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2013. – T. 37. – №. 9. – C. 2111-2124.
88. Endo T. et al. Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage // *Behavioural brain research*. – 2011. – T. 221. – №. 1. – C. 172-181.
89. Fanselow M. S., Poulos A. M. The neuroscience of mammalian associative learning // *Annual review of psychology*. – 2005. – T. 56. – №. 1. – C. 207-234.
90. Mizushima N. Autophagy: process and function // *Genes & development*. – 2007. – T. 21. – №. 22. – C. 2861-2873.
91. Sarkar S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers // *Biochemical Society Transactions*. – 2013. – T. 41. – №. 5. – C. 1103-1130.
92. Hamasaki M. et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites // *Nature*. – 2013. – T. 495. – №. 7441. – C. 389-393.
93. Berg T. O. et al. Isolation and characterization of rat liver amphisomes: evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – T. 273. – №. 34. – C. 21883-21892.
94. Klionsky D. J. et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes // *Autophagy*. – 2011. – T. 7. – №. 11. – C. 1273-1294.
95. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2004. – T. 36. – №. 12. – C. 2503-2518.
96. Nakatogawa H., Ichimura Y., Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion // *Cell*. – 2007. – T. 130. – №. 1. – C. 165-178.
97. Kabeya Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing // *The EMBO journal*. – 2000. – T. 19. – №. 21. – C. 5720-5728.
98. Tanida I. et al. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3-and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279. – №. 35. – C. 36268-36276.

99. Huang J., Klionsky D. J. Autophagy and human disease // *Cell cycle*. – 2007. – T. 6. – №. 15. – C. 1837-1849.
100. Soykan T., Haucke V., Kuijpers M. Mechanism of synaptic protein turnover and its regulation by neuronal activity // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2021. – T. 69. – C. 76-83.
101. Houtman J. et al. Beclin1-driven autophagy modulates the inflammatory response of microglia via NLRP 3 // *The EMBO journal*. – 2019. – T. 38. – №. 4. – C. e99430.
102. Reddy A. P. et al. Selective serotonin reuptake inhibitor citalopram ameliorates cognitive decline and protects against amyloid beta-induced mitochondrial dynamics, biogenesis, autophagy, mitophagy and synaptic toxicities in a mouse model of Alzheimer's disease // *Human molecular genetics*. – 2021. – T. 30. – №. 9. – C. 789-810.
103. Checler F., Goiran T., Alves da Costa C. Presenilins at the crossroad of a functional interplay between PARK2/PARKIN and PINK1 to control mitophagy: implication for neurodegenerative diseases // *Autophagy*. – 2017. – T. 13. – №. 11. – C. 2004-2005.
104. Calabrò M. et al. The biological pathways of Alzheimer disease: A review // *AIMS neuroscience*. – 2021. – T. 8. – №. 1. – C. 86.
105. Madsen D. A. et al. Interaction between Parkin and α -synuclein in PARK2-mediated Parkinson's disease // *Cells*. – 2021. – T. 10. – №. 2. – C. 283.
106. Cai Q., Ganesan D. Regulation of neuronal autophagy and the implications in neurodegenerative diseases // *Neurobiology of Disease*. – 2021. – C. 105582.
107. Goudarzi S. et al. Insights Into Parkin-Mediated Mitophagy in Alzheimer's Disease: A Systematic Review // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2021. – C. 443.
108. Han Y. et al. β -Asarone improves learning and memory in A β 1-42-induced Alzheimer's disease rats by regulating PINK1-Parkin-mediated mitophagy // *Metabolic Brain Disease*. – 2020. – T. 35. – №. 7. – C. 1109-1117.
109. Jiang T. et al. Temsirolimus attenuates tauopathy in vitro and in vivo by targeting tau hyperphosphorylation and autophagic clearance // *Neuropharmacology*. – 2014. – T. 85. – C. 121-130.
110. Li L. et al. Autophagy enhancer carbamazepine alleviates memory deficits and cerebral amyloid- β pathology in a mouse model of Alzheimer's disease // *Current Alzheimer Research*. – 2013. – T. 10. – №. 4. – C. 433-441.

111. Button R. W., Luo S., Rubinsztein D. C. Autophagic activity in neuronal cell death // *Neuroscience bulletin*. – 2015. – Т. 31. – №. 4. – С. 382-394.
112. Di Meco A. et al. Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease: mechanistic insights and new therapeutic opportunities // *Biological psychiatry*. – 2020. – Т. 87. – №. 9. – С. 797-807.
113. Cortes C. J., La Spada A. R. TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: Molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities // *Neurobiology of disease*. – 2019. – Т. 122. – С. 83-93.
114. Switon K. et al. Molecular neurobiology of mTOR // *Neuroscience*. – 2017. – Т. 341. – С. 112-153.
115. Rusmini P. et al. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration // *Autophagy*. – 2019. – Т. 15. – №. 4. – С. 631-651.
116. Mizunoe Y. et al. Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1–Nrf2 and autophagy pathways // *Redox biology*. – 2018. – Т. 15. – С. 115-124.
117. Khan S. H., Kumar R. Trehalose induced conformational changes in the amyloid- β peptide // *Pathology-Research and Practice*. – 2017. – Т. 213. – №. 6. – С. 643-648.
118. Heneka M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease // *The Lancet Neurology*. – 2015. – Т. 14. – №. 4. – С. 388-405.
119. Salminen A. et al. Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors // *Progress in neurobiology*. – 2009. – Т. 87. – №. 3. – С. 181-194.
120. Ключник Т. П., Андросова Л. В., Дупин А. М. Врожденный иммунитет и болезнь Альцгеймера // *Психиатрия*. – 2011. – №. 1. – С. 52-58.
121. Hansen D. V., Hanson J. E., Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease // *Journal of Cell Biology*. – 2018. – Т. 217. – №. 2. – С. 459-472.
122. Hopperton K. E. et al. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review // *Molecular psychiatry*. – 2018. – Т. 23. – №. 2. – С. 177-198.
123. Mesquita S. D. et al. Lipocalin 2 modulates the cellular response to amyloid beta // *Cell Death & Differentiation*. – 2014. – Т. 21. – №. 10. – С. 1588-1599.
124. Cline E. N. et al. The amyloid- β oligomer hypothesis: beginning of the third decade // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2018. – Т. 64. – №. s1. – С. S567-S610.

125. Dekens D. W. et al. Lipocalin 2 contributes to brain iron dysregulation but does not affect cognition, plaque load, and glial activation in the J20 Alzheimer mouse model // *Journal of neuroinflammation*. – 2018. – Т. 15. – №. 1. – С. 1-13.
126. Olson B. et al. Chronic cerebral lipocalin 2 exposure elicits hippocampal neuronal dysfunction and cognitive impairment // *Brain, behavior, and immunity*. – 2021. – Т. 97. – С. 102-118.
127. Kang S. S. et al. Lipocalin-2 protects the brain during inflammatory conditions // *Molecular psychiatry*. – 2018. – Т. 23. – №. 2. – С. 344-350.
128. Зимницкая О. В., Можейко Е. Ю., Петрова М. М. Биомаркеры сосудистой когнитивной дисфункции // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2021. – Т. 20. – №. 3. – С. 114-121.
129. Araki W., Kametani F. Protection against Amyloid- β Oligomer Neurotoxicity by Small Molecules with Antioxidative Properties: Potential for the Prevention of Alzheimer's Disease Dementia // *Antioxidants*. – 2022. – Т. 11. – №. 1. – С. 132.
130. Меньщикова Е. Б., Ткачёв В. О., Зенков Н. К. Редокс-чувствительная сигнальная система Nrf2/ARE и ее роль при воспалении // *Молекулярная биология*. – 2010. – Т. 44. – №. 3. – С. 389-404.
131. Ren P. et al. Nrf2 ablation promotes Alzheimer's disease-like pathology in APP/PS1 transgenic mice: the role of neuroinflammation and oxidative stress // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2020. – Т. 2020.
132. Pajares M. et al. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes // *Autophagy*. – 2016. – Т. 12. – №. 10. – С. 1902-1916.
133. Bahn G. et al. NRF2/ARE pathway negatively regulates BACE1 expression and ameliorates cognitive deficits in mouse Alzheimer's models // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Т. 116. – №. 25. – С. 12516-12523.
134. Kobayashi E. H. et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription // *Nature communications*. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-14.
135. Liddell J. R. Are astrocytes the predominant cell type for activation of Nrf2 in aging and neurodegeneration? // *Antioxidants*. – 2017. – Т. 6. – №. 3. – С. 65.
136. Ramsey C. P. et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. – 2007. – Т. 66. – №. 1. – С. 75-85.

137. Yang L. et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow // *Blood*. – 2005. – T. 106. – №. 2. – C. 584-592.
138. Akiyama H. et al. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 by a subset of astrocytes in Alzheimer disease and some other degenerative neurological disorders // *Acta neuropathologica*. – 1993. – T. 85. – №. 6. – C. 628-634.
139. Szklarczyk D. et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets // *Nucleic acids research*. – 2019. – T. 47. – №. D1. – C. D607-D613.
140. Lucin K. M. et al. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease // *Neuron*. – 2013. – T. 79. – №. 5. – C. 873-886.
141. Li D. et al. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type // *The FASEB Journal*. – 2016. – T. 30. – №. 10. – C. 3388-3399.
142. Williams A. et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway // *Nature chemical biology*. – 2008. – T. 4. – №. 5. – C. 295-305.
143. Sarkar S. et al. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – T. 282. – №. 8. – C. 5641-5652.
144. Selkoe D. J., Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years // *EMBO molecular medicine*. – 2016. – T. 8. – №. 6. – C. 595-608.
145. Mroczko B. et al. Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease // *Journal of Neural Transmission*. – 2018. – T. 125. – №. 2. – C. 177-191.
146. Park S. H. et al. Protective effect of the phosphodiesterase III inhibitor cilostazol on amyloid β -induced cognitive deficits associated with decreased amyloid β accumulation // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2011. – T. 408. – №. 4. – C. 602-608.
147. Song S. et al. Transient Microneedle Insertion into Hippocampus Triggers Neurogenesis and Decreases Amyloid Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Cell Transplantation*. – 2016. – T. 25. – №. 10. – C. 1853-1861.

148. Дубровина Н. И. и др. Выработка и угашение условной реакции пассивного избегания у мышей с генетическим нокаутом моноаминоксидазы А // Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. – 2005. – Т. 55. – №. 2. – С. 221-226.
149. Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents // Nature protocols. – 2007. – Т. 2. – №. 2. – С. 322-328.
150. Deacon R. M. J., Rawlins J. N. P. T-maze alternation in the rodent // Nature protocols. – 2006. – Т. 1. – №. 1. – С. 7-12.
151. Kiryk A. et al. IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior—20 years perspective // Behavioural Brain Research. – 2020. – Т. 388. – С. 112620.
152. Paxinos G., Franklin K. B. J. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. – Academic press, 2019.
153. Ginzinger D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream // Experimental hematology. – 2002. – Т. 30. – №. 6. – С. 503-512.
154. Flood J. F., Morley J. E., Roberts E. An amyloid β -protein fragment, A β [12–28], equipotently impairs post-training memory processing when injected into different limbic system structures // Brain research. – 1994. – Т. 663. – №. 2. – С. 271-276.
155. Flood J. F., Morley J. E., Roberts E. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1991. – Т. 88. – №. 8. – С. 3363-3366.
156. McDonald M. P. et al. Effects of an exogenous β -amyloid peptide on retention for spatial learning // Behavioral and neural biology. – 1994. – Т. 62. – №. 1. – С. 60-67.
157. Nabeshima T., Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by β -amyloid protein in rats // The Tohoku journal of experimental medicine. – 1994. – Т. 174. – №. 3. – С. 241-249.
158. McDonald M. P. et al. Reversal of β -amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues // Neurobiology of learning and memory. – 1996. – Т. 65. – №. 1. – С. 35-47.
159. Maurice T., Lockhart B. P., Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction // Brain research. – 1996. – Т. 706. – №. 2. – С. 181-193.

160. Yamaguchi Y., Kawashima S. Effects of amyloid- β -(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat // *European Journal of pharmacology*. – 2001. – T. 412. – №. 3. – C. 265-272.
161. Stepanichev M. Y. et al. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats // *Brain research bulletin*. – 2003. – T. 61. – №. 2. – C. 197-205.
162. Delobette S., Privat A., Maurice T. In vitro aggregation facilitates β -amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia in the rat // *European journal of pharmacology*. – 1997. – T. 319. – №. 1. – C. 1-4.
163. Chen S. Y., Wright J. W., Barnes C. D. The neurochemical and behavioral effects of β -amyloid peptide (25–35) // *Brain research*. – 1996. – T. 720. – №. 1-2. – C. 54-60.
164. Yamaguchi Y., Kawashima S. Effects of amyloid- β -(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat // *European Journal of pharmacology*. – 2001. – T. 412. – №. 3. – C. 265-272.
165. Dineley K. T. et al. Amyloid- β oligomers impair fear conditioned memory in a calcineurin-dependent fashion in mice // *Journal of neuroscience research*. – 2010. – T. 88. – №. 13. – C. 2923-2932.
166. Shallie O. F., Mabandla M. V. Amyloid-beta (1-42) lesion of CA1 rat dorsal hippocampus reduces contextual fear memory and increases expression of microglial genes regulating neuroinflammation // *Behavioural Brain Research*. – 2020. – T. 393. – C. 112795.
167. White J. D. et al. Intraventricular murine A β infusion elicits hippocampal inflammation and disrupts the consolidation, but not retrieval, of conditioned fear in C57BL6/J mice // *Behavioural Brain Research*. – 2020. – T. 378. – C. 112303.
168. Figueiredo C. P. et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight a β oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – T. 33. – №. 23. – C. 9626-9634.
169. Wang L. S. et al. Cajaninstilbene acid ameliorates cognitive impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid- β 1–42 oligomers // *Frontiers in pharmacology*. – 2019. – T. 10. – C. 1084.
170. Thal D. R. et al. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD // *Neurology*. – 2002. – T. 58. – №. 12. – C. 1791-1800.
171. Baudrimont A. et al. Multiplexed gene control reveals rapid mRNA turnover // *Science advances*. – 2017. – T. 3. – №. 7. – C. e1700006.

172. Mathieson T. et al. Systematic analysis of protein turnover in primary cells // *Nature communications*. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-10.
173. Tang H., Harte M. Investigating Markers of the NLRP3 Inflammasome Pathway in Alzheimer's Disease: A Human Post-Mortem Study // *Genes*. – 2021. – Т. 12. – №. 11. – С. 1753.
174. Benitez D. P. et al. Knock-in models related to Alzheimer's disease: synaptic transmission, plaques and the role of microglia // *Molecular neurodegeneration*. – 2021. – Т. 16. – №. 1. – С. 1-20.
175. Roy E. R. et al. Type I interferon response drives neuroinflammation and synapse loss in Alzheimer disease // *The Journal of clinical investigation*. – 2020. – Т. 130. – №. 4. – С. 1912-1930.
176. Степаничев М. Ю. и др. Исследование эффектов центрального введения β -амилоидного пептида (25-35): патоморфологические изменения в гиппокампе и нарушение пространственной памяти // *Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова*. – 2004. – Т. 54. – №. 5. – С. 705-711.
177. Gonzalo-Ruiz A. et al. Effects of lipids and aging on the neurotoxicity and neuronal loss caused by intracerebral injections of the amyloid- β peptide in the rat // *Experimental neurology*. – 2006. – Т. 197. – №. 1. – С. 41-55.
178. Kang H. et al. Role of Lipocalin-2 in Amyloid-Beta Oligomer-Induced Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Antioxidants*. – 2021. – Т. 10. – №. 11. – С. 1657.
179. Bahn G. et al. NRF2/ARE pathway negatively regulates BACE1 expression and ameliorates cognitive deficits in mouse Alzheimer's models // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Т. 116. – №. 25. – С. 12516-12523.
180. Короленко Т. А. и др. Регуляторная роль цистатина С в аутофагии и нейродегенерации // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2019. – Т. 23. – №. 4. – С. 390-397.
181. Botella J. et al. Exercise and Training Regulation of Autophagy Markers in Human and Rat Skeletal Muscle // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23. – №. 5. – С. 2619.
182. Han Y. et al. β -Asarone improves learning and memory in A β 1-42-induced Alzheimer's disease rats by regulating PINK1-Parkin-mediated mitophagy // *Metabolic Brain Disease*. – 2020. – Т. 35. – №. 7. – С. 1109-1117.
183. Katzmarski N. et al. A β oligomers trigger and accelerate A β seeding // *Brain Pathology*. – 2020. – Т. 30. – №. 1. – С. 36-45.

184. Haass C., Selkoe D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2007. – T. 8. – №. 2. – C. 101-112.
185. Kubo T. et al. In vivo conversion of racemized β -amyloid ([D-Ser26] A β 1–40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser26] A β 25–35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients // *Journal of neuroscience research*. – 2002. – T. 70. – №. 3. – C. 474-483.
186. Liao M. Q. et al. The correlation between neurotoxicity, aggregative ability and secondary structure studied by sequence truncated A β peptides // *FEBS letters*. – 2007. – T. 581. – №. 6. – C. 1161-1165.
187. Peters C. et al. Differential membrane toxicity of amyloid- β fragments by pore forming mechanisms // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2016. – T. 51. – №. 3. – C. 689-699.
188. Gauthier-Umaña C. et al. Acute Effects of Two Different Species of Amyloid- β on Oscillatory Activity and Synaptic Plasticity in the Commissural CA3-CA1 Circuit of the Hippocampus // *Neural plasticity*. – 2020. – T. 2020.
189. Ivankov O. et al. Amyloid-beta peptide (25–35) triggers a reorganization of lipid membranes driven by temperature changes // *Scientific reports*. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 1-9.
190. McLarnon J. G. Correlated inflammatory responses and neurodegeneration in peptide-injected animal models of Alzheimer's disease // *BioMed research international*. – 2014. – T. 2014.
191. Kane A. E. et al. Sex differences in healthspan predict lifespan in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease // *Frontiers in aging neuroscience*. – 2018. – T. 10. – C. 172.
192. Fan S. et al. PI3K/AKT/mTOR/p70S6K pathway is involved in A β 25-35-induced autophagy // *BioMed Research International*. – 2015. – T. 2015.
193. Kaeberlein M., Galvan V. Rapamycin and Alzheimer's disease: time for a clinical trial? // *Science translational medicine*. – 2019. – T. 11. – №. 476. – C. eaar4289.
194. Hosseinpour-Moghaddam K., Caraglia M., Sahebkar A. Autophagy induction by trehalose: Molecular mechanisms and therapeutic impacts // *Journal of cellular physiology*. – 2018. – T. 233. – №. 9. – C. 6524-6543.
195. DeBosch B. J. et al. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis // *Science signaling*. – 2016. – T. 9. – №. 416. – C. ra21-ra21.

196. Wang Q., Ren J. mTOR-Independent autophagy inducer trehalose rescues against insulin resistance-induced myocardial contractile anomalies: Role of p38 MAPK and Foxo1 // *Pharmacological research*. – 2016. – Т. 111. – С. 357-373.
197. Palmieri M. et al. mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases // *Nature communications*. – 2017. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-19.
198. Jang M. et al. AMPK contributes to autophagosome maturation and lysosomal fusion // *Scientific reports*. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-10.
199. Пупышев А. Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты // *Цитология*. – 2014. – Т. 56. – №. 3. – С. 179-196.
200. Bordi M. et al. Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy // *Autophagy*. – 2016. – Т. 12. – №. 12. – С. 2467-2483.
201. Di Malta C., Cinque L., Settembre C. Transcriptional regulation of autophagy: mechanisms and diseases // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2019. – Т. 7. – С. 114.
202. Sciarretta S. et al. Trehalose-induced activation of autophagy improves cardiac remodeling after myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2018. – Т. 71. – №. 18. – С. 1999-2010.
203. Lapierre L. R. et al. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging // *Autophagy*. – 2015. – Т. 11. – №. 6. – С. 867-880.
204. Saikia M. et al. Codon optimality controls differential mRNA translation during amino acid starvation // *Rna*. – 2016. – Т. 22. – №. 11. – С. 1719-1727.
205. Caccamo A. et al. Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature // *Journal of Neuroscience*. – 2014. – Т. 34. – №. 23. – С. 7988-7998.
206. Jeong Y. et al. MK-0677, a ghrelin agonist, alleviates amyloid beta-related pathology in 5XFAD mice, an animal model of Alzheimer's disease // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Т. 19. – №. 6. – С. 1800.
207. Amin F. U., Shah S. A., Kim M. O. Vanillic acid attenuates A β 1-42-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice // *Scientific reports*. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-15.

208. Berglund R. et al. Microglial autophagy-associated phagocytosis is essential for recovery from neuroinflammation // *Science immunology*. – 2020. – T. 5. – №. 52. – C. eabb5077.
209. Guden D. S. et al. mTOR inhibition as a possible pharmacological target in the management of systemic inflammatory response and associated neuroinflammation by lipopolysaccharide challenge in rats // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2021. – T. 99. – №. 9. – C. 921-934.
210. Wang J. et al. Rapamycin modulates the Proinflammatory memory-Like response of microglia induced by BAFF // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – T. 12. – C. 639049.
211. Pietrzak R. H. et al. Amyloid- β , anxiety, and cognitive decline in preclinical Alzheimer disease: a multicenter, prospective cohort study // *JAMA psychiatry*. – 2015. – T. 72. – №. 3. – C. 284-291.
212. Pinz M. P. et al. Current advances of pharmacological properties of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline: prevention of cognitive deficit and anxiety in Alzheimer's disease model // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – T. 105. – C. 1006-1014.
213. Luo R. et al. Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model // *Autophagy*. – 2020. – T. 16. – №. 1. – C. 52-69.
214. Kumari S., Deshmukh R. β -lactam antibiotics to tame down molecular pathways of Alzheimer's disease // *European Journal of Pharmacology*. – 2021. – T. 895. – C. 173877.
215. Gonçalves-Ribeiro J. et al. Glutamate transporters in hippocampal LTD/LTP: not just prevention of excitotoxicity // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – T. 13. – C. 357.
216. Hefendehl J. K. et al. Mapping synaptic glutamate transporter dysfunction in vivo to regions surrounding A β plaques by iGluSnFR two-photon imaging // *Nature communications*. – 2016. – T. 7. – №. 1. – C. 1-13.
217. Xin S. H. et al. Clearance of amyloid beta and tau in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapy // *Neurotoxicity research*. – 2018. – T. 34. – №. 3. – C. 733-748.
218. Korolenko T. A. et al. Early Parkinson's Disease-Like Pathology in a Transgenic Mouse Model Involves a Decreased Cst3 mRNA Expression But Not Neuroinflammatory Response in the Brain // *Medical University*. – 2020. – T. 3. – №. 2. – C. 66-78.
219. Wu J. et al. Amyloid Fibril-Induced Astrocytic Glutamate Transporter Disruption Contributes to Complement C1q-Mediated Microglial Pruning of Glutamatergic Synapses // *Molecular Neurobiology*. – 2020. – T. 57. – №. 5. – C. 2290-2300.

220. Codita A. et al. Impaired behavior of female tg-ArcSwe APP mice in the IntelliCage: A longitudinal study // Behavioural brain research. – 2010. – T. 215. – №. 1. – C. 83-94.
221. Masuda A. et al. Cognitive deficits in single App knock-in mouse models // Neurobiology of learning and memory. – 2016. – T. 135. – C. 73-82.
222. Weng J. C. et al. Ceftriaxone prevents the neurodegeneration and decreased neurogenesis seen in a Parkinson's disease rat model: an immunohistochemical and MRI study // Behavioural Brain Research. – 2016. – T. 305. – C. 126-139.
223. Ho Y. J. et al. Use of ceftriaxone in treating cognitive and neuronal deficits associated with dementia with lewy bodies // Frontiers in neuroscience. – 2019. – T. 13. – C. 507.
224. Wang R. et al. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism // Aging cell. – 2017. – T. 16. – №. 3. – C. 564-574.
225. Kobayashi A. et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2 // Molecular and cellular biology. – 2004. – T. 24. – №. 16. – C. 7130-7139.
226. Xu M. et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – T. 112. – №. 46. – C. E6301-E6310.
227. Cui C. et al. Neuroprotective effect of ceftriaxone in a rat model of traumatic brain injury // Neurological Sciences. – 2014. – T. 35. – №. 5. – C. 695-700.
228. Xia S. et al. Combined antioxidant, anti-inflammaging and mesenchymal stem cell treatment: a possible therapeutic direction in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease // Aging and disease. – 2020. – T. 11. – №. 1. – C. 129.