

АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт  
биорегуляции и геронтологии»

*На правах рукописи*



**ИЛЬИНА**  
**Анастасия Романовна**

**КОРРЕКЦИЯ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ  
НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ГИППОКАМПА КОРОТКИМИ ПЕПТИДАМИ  
В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *IN VIVO***

3.3.3 – Патологическая физиология

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:**

з.д.н. РФ,  
профессор, д.м.н. Г.А. Рыжак

Санкт-Петербург – 2024

*Посвящается светлой памяти*

дорогого Учителя и идейного вдохновителя  
академика РАН, заслуженного деятеля науки РФ, д.м.н., профессора  
Хавинсона Владимира Хацкелевича

Искренняя благодарность за знания, опыт, поддержку и вдохновение –  
без этого работа была бы невыполнима.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>ОГЛАВЛЕНИЕ</i> .....	3
<i>ВВЕДЕНИЕ</i> .....	6
<i>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</i> .....	17
1.1. Болезнь Альцгеймера. Ключевые аспекты патогенеза .....	17
1.2. Изменение морфофункционального состояния нейронных сетей гиппокампа как основа когнитивной дисфункции .....	19
1.2.1 Функциональные аспекты синаптической пластичности .....	20
1.2.2 Морфологические аспекты синаптической пластичности .....	22
1.3. Возрастные особенности моделирования болезни Альцгеймера у мышей линии 5xFAD .....	23
1.4. Фармакотерапия болезни Альцгеймера: современные представления и перспективы.....	25
1.4.1. Мировой опыт разработки фармакотерапии БА.....	25
1.4.2. Пептидные биорегуляторы – перспективные нейропротекторы ....	27
1.5. Подходы для первичного скрининга фармакотерапевтических агентов .	29
<i>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</i> .....	33
2.1. Базы данных.....	33
2.2. Животные .....	35
2.3. Определение генотипа мышей.....	36
2.3.1. Выделение геномной ДНК методом фенол-хлороформной экстракции.....	36
2.3.2. Полимеразная цепная реакция.....	36
2.3.3. Электрофорез ДНК .....	37
2.4. Перфузия.....	38
2.5. Электрофизиологические методы исследования .....	38

2.5.1. Подготовка переживающих срезов гиппокампа .....	38
2.5.2. Стимуляция и регистрация полевых потенциалов .....	39
2.5.3. Количественный анализ.....	40
2.6. Морфологическая характеристика нейрональных контактов.....	41
2.6.1. Подготовка фиксированных срезов мозга.....	41
2.6.2. Морфометрический анализ.....	41
2.7. Статистический анализ.....	42
<i>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</i>	<i>44</i>
3.1. Разработка подхода по прогнозированию биологических мишеней нейропротекторного действия коротких пептидов при болезни Альцгеймера у человека.....	44
3.1.1. Дизайн разработки .....	44
3.1.2. Реализация подхода.....	45
3.2. Влияние коротких пептидов на синаптическую пластичность в мозге мышей линии 5xFAD в модели болезни Альцгеймера.....	54
3.3. Характеристика модели прогрессирующей синаптической дегенерации 5xFAD-M при болезни Альцгеймера .....	59
3.3.1. Получение трансгенной линии 5xFAD-M .....	59
3.3.2. Оценка экспрессии зеленого флуоресцентного белка в мозге мышей линии 5xFAD-M.....	61
3.3.3. Патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M разного возраста...	64
3.3.4. Патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M разного пола.....	68
3.4. Влияние коротких пептидов на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD- M в модели болезни Альцгеймера .....	71

3.4.1. Влияние пептидов EDR и KED на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у самцов мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев.....	75
3.4.2. Влияние пептидов EDR и KED на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у самок мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев.....	79
<i>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</i> .....	83
<i>ВЫВОДЫ</i> .....	87
<i>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</i> .....	89
<i>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</i> .....	91
<i>УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ</i> .....	92

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

В мире более 55 миллионов человек живут с деменцией, и ежегодно регистрируется около 10 миллионов новых случаев согласно ВОЗ. В настоящее время деменция является седьмой по значимости причиной смерти среди всех болезней и одной из основных причин инвалидности среди людей пожилого и старческого возраста во всем мире. Ожидается, что к 2030 году число больных достигнет 82 млн, а к 2050 – 152 млн. Затраты на лечение деменции составляют 1 триллион долларов в год, что соответствует более 1% мирового внутреннего валового продукта [Lynch C., 2020].

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание и наиболее распространенная причина деменции у лиц пожилого и старческого возраста [Fan L. et al., 2020]. БА является одной из наиболее распространенных причин смерти, наступающей в течение 5-12 лет после появления первых симптомов. Актуальность диссертационного исследования подчеркивается отсутствием эффективных соединений, позволяющих предотвратить прогрессирование БА [Mehta D. et al., 2017]. На фоне глобальной тенденции к увеличению продолжительности жизни населения поиск эффективных и безопасных потенциальных терапевтических соединений для лечения БА приобретает все большую значимость.

**Степень разработанности темы исследования.** Мировые данные последних лет подчеркивают системный характер патогенеза БА, что обуславливает низкую эффективность существующих таргетных методов терапии заболевания [Ramsay R.R. et al., 2018]. Перспективными потенциальными нейропротекторными соединениями являются короткие пептиды EDR (Glu – Asp – Arg) и KED (Lys – Glu – Asp), синтезированные на основе изучения аминокислотного состава экстрактов, выделенных из тканей головного мозга и сосудов крупного рогатого скота, соответственно. В предварительных экспериментах показано, что пептиды обладают

нейропротекторным эффектом в модели БА *in vitro* [Kraskovskaya N.A. et al., 2017].

Нарушение когнитивных функций при БА тесно коррелирует с потерей синапсов нейронов в области мозга, ответственной за формирование памяти [Terry R.D. et al., 1991], что отражается в изменении морфофункционального состояния нейронных сетей гиппокампа. При этом показателями морфофункционального состояния нейронных сетей являются нейропластичность и морфология постсинаптических контактов нейронов (дендритных шипиков). Следовательно, изучение влияния потенциальных терапевтических агентов на нейропластичность и морфологию дендритных шипиков нейронов гиппокампа позволит выявить перспективное нейропротекторное соединение для профилактики и терапевтической коррекции когнитивных нарушений при БА.

#### **Цель и задачи исследования**

**Цель исследования** – оценить влияние коротких пептидов на патоморфологические изменения нейронных сетей гиппокампа в модели болезни Альцгеймера *in vivo*.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие **задачи**:

1) Разработать скрининговый подход для выявления наиболее перспективного короткого пептида для коррекции нейродегенеративных процессов при болезни Альцгеймера.

2) Оценить влияние коротких пептидов на формирование долговременной потенциации в гиппокампе мышей линии 5xFAD в модели болезни Альцгеймера *in vivo*.

3) Разработать модель 5xFAD-M для анализа прогрессирующей синаптической дегенерации при болезни Альцгеймера *in vivo*.

4) Оценить возрастные и гендер-ассоциированные патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M в модели болезни Альцгеймера *in vivo*.

5) Оценить влияние коротких пептидов на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M в модели болезни Альцгеймера *in vivo*.

### **Научная новизна**

Впервые разработан скрининговый подход, в ходе которого пептид EDR определен как наиболее перспективный короткий пептид для коррекции нейродегенеративных процессов при болезни Альцгеймера. В соответствии с разработанным подходом выявлено, что потенциальными мишенями нейропротекторного действия короткого пептида EDR являются промоторные зоны генов, вовлеченных в развитие болезни Альцгеймера и связанных с ключевыми биологическими процессами: окислительным фосфорилированием, регуляцией окислительного стресса, метаболизмом амилоида, функционированием микротрубочек, кальциевым сигналингом, транспортом глюкозы и апоптозом.

Впервые оценено влияние коротких пептидов на формирование долговременной потенциации в гиппокампе мышей линии 5xFAD в модели БА *in vivo* и показано, что короткий пептид KED способствует развитию тенденции к ее восстановлению.

Для анализа патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов выведена трансгенная линия мышей 5xFAD-M. У мышей данной линии впервые установлена прогрессирующая элиминация наиболее функциональных постсинаптических контактов на дендритах нейронов в CA1 области гиппокампа в возрасте 5 месяцев. С помощью полученной модели впервые оценена морфология дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа мышей в модели БА *in vivo* под воздействием коротких пептидов EDR и KED.

Впервые установлено, что курсовое введение пептидов EDR и KED самцам мышей линии 5xFAD-M способствует восстановлению плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа и относительного количества наиболее функциональных шипиков грибовидного типа до уровня нормы, тогда как у самок мышей линии 5xFAD-M курсовое введение пептида EDR способствует только увеличению плотности дендритных шипиков, а курсовое введение пептида KED – снижению относительного количества дендритных шипиков тонкого типа по сравнению с контролем.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанный скрининговый подход позволяет прогнозировать биологические мишени действия коротких пептидов при БА у человека, что дает возможность осуществлять выбор потенциальных агентов для разработки терапевтического средства для профилактики и лечения заболевания.

Выявленная прогрессирующая элиминация наиболее функциональных дендритных шипиков грибовидного типа в гиппокампе мышей выведенной трансгенной линии 5xFAD-M свидетельствует о том, что данная линия мышей может быть использована для тестирования потенциальных лекарственных соединений в условиях прогрессирующей синаптической дегенерации при болезни Альцгеймера.

Выявленная нормализация плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа и относительного количества наиболее функциональных шипиков грибовидного типа у мышей линии 5xFAD-M при курсовом введении пептидов EDR и KED свидетельствует о том, что изученные трипептиды могут являться активными соединениями для разработки эффективного и безопасного лекарственного препарата для профилактики и лечения болезни Альцгеймера.

Настоящая работа имеет высокую медико-социальную и экономическую значимость в том числе и для региона Санкт-Петербурга и Ленинградской области ввиду того, что, согласно данным Федеральной

службы государственной статистики, на 1 января 2023 г. суммарная доля лиц пожилого и старческого возраста (возрастная категория лиц с повышенным риском развития БА) по Санкт-Петербургу и Ленинградской области превышает 25%. Соответственно, разработка эффективного и безопасного терапевтического соединения будет способствовать увеличению периода активного долголетия, повышению качества и продолжительности жизни лиц пожилого и старческого возраста, страдающих БА.

### **Методология и методы исследования**

Методология исследования заключалась в последовательной реализации задач исследования в ходе четырех этапов. На первом этапе разрабатывали скрининговый подход для выявления наиболее перспективного короткого пептида для терапии болезни Альцгеймера у человека. Для этого использовали общедоступные базы данных промоторных последовательностей генов человека The Eukaryotic Promoter Database (EPD) [Périer R.C. et al., 2000], биологических путей человека PathCards [Belinky F. et al., 2015], STRING [Szklarczyk D. et al., 2019].

На втором этапе изучали влияние коротких пептидов на формирование долговременной потенциации в гиппокампе мышей линии 5xFAD с помощью электрофизиологических методов регистрации полевых потенциалов в переживающих срезе гиппокампа. В соответствии с литературными данными, описывающими особенности развития патогенеза БА у мышей линии 5xFAD, формирование долговременной потенциации в гиппокампе мышей оценивали в возрасте 4 месяцев, а короткие пептиды EDR и KED (400 мкг/кг), а также эквивалентное количество физиологического раствора вводили ежедневно в течение 2 месяцев до исследования. Экспериментальные группы были сформированы следующим образом: 1) мыши дикого типа линии B6SJL (контроль 1) с введением физиологического раствора (n=10; 5 самцов, 5 самок); 2) мыши линии 5xFAD с введением физиологического раствора (контроль 2, n=10; 5 самцов, 5 самок); 3) мыши линии 5xFAD с введением

пептида EDR 400 мкг/кг (n=10; 5 самцов, 5 самок); 4) мышцы линии 5xFAD с введением пептида KED 400 мкг/кг (n=10; 5 самцов, 5 самок).

Пептиды и эквивалентное количество физиологического раствора вводили животным однократно каждый день [Eremin K.O. et al., 2005].

На третьем этапе выводили трансгенную линию мышей 5xFAD-M для изучения морфологических изменений дендритных шипиков нейронов при БА. Ввиду возрастных особенностей проявления патогенеза БА у мышей линии 5xFAD, подробно изложенных в литературном обзоре, и с учетом того, что морфологические изменения в постсинаптических структурах являются следствием изменения долговременной потенциации, а также принимая во внимание этические принципы обращения с животными, у мышей линии 5xFAD-M оценивали морфологию дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа в возрасте 4 и 5 месяцев с целью выявления достоверных изменений на начальных этапах развития БА. Экспериментальные группы были сформированы следующим образом: 1) мыши самцы линии M в возрасте 4 месяцев (контроль 1, n=5);

2) мыши самцы линии 5xFAD в возрасте 4 месяцев (n=5); 3) мыши самцы линии M в возрасте 5 месяцев (контроль 1, n=5); 4) мыши самцы линии 5xFAD в возрасте 5 месяцев (n=5).

На четвертом этапе оценивали влияние коротких пептидов на морфологию дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа в возрасте 5 месяцев, так как на втором этапе исследования именно в этот период выявлены достоверные изменения количества наиболее функциональных постсинаптических контактов в мозге мышей линии 5xFAD. Пептиды в концентрации 400 мкг/кг и эквивалентное количество физиологического раствора вводили в течение 2 мес (начиная с 3 мес) до исследования ежедневно однократно [Eremin K.O. et al., 2005]. Экспериментальные группы были следующими: 1) мыши трансгенной линии M (контроль 1) с введением физиологического раствора (n=10); 2) мыши

линии 5xFAD-M с введением физиологического раствора (контроль 2, n=10); 3) мыши линии 5xFAD-M с введением пептида EDR (n=10); 4) мыши линии 5xFAD-M с введением пептида KED (n=10).

Работа рассмотрена и одобрена Комитетом по этике АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (протокол № 02 заседания от 25 июня 2020 г.).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанный скрининговый подход позволяет определять наиболее перспективные короткие пептиды для профилактики и коррекции нейродегенеративных процессов.

2. Выведенная трансгенная линия мышей 5xFAD-M является валидной моделью для оценки прогрессирующей синаптической дегенерации при болезни Альцгеймера *in vivo* и тестирования потенциальных терапевтических агентов. У мышей линии 5xFAD-M наблюдается прогрессирующая элиминация наиболее функциональных дендритных шипиков грибовидного типа в CA1 области гиппокампа в возрасте 5 месяцев.

3. Курсовое введение пептидов EDR и KED способствует восстановлению плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа и относительного количества дендритных шипиков грибовидного типа до уровня нормы при курсовом введении мышам-самцам линии 5xFAD-M в модели болезни Альцгеймера.

4. Курсовое введение пептидов EDR и KED способствует увеличению плотности дендритных шипиков и снижению относительного количества дендритных шипиков тонкого типа, соответственно, на нейронах CA1 области гиппокампа при курсовом введении мышам-самкам линии 5xFAD-M в модели болезни Альцгеймера.

### **Степень достоверности и апробация результатов диссертации**

Достоверность результатов диссертационного исследования обусловлена применением современных методов экспериментальной работы,

количественного и статистического анализа. Результаты диссертационного исследования представлены на научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2018), первой учредительной конференции Международной Нейробиопсихиатрической Ассоциации «Современная психиатрия» (Санкт-Петербург, 2019), XXIV научной школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва, 2020), международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине» Научно-исследовательского института медицинской приматологии (Сочи, 2020), XXI зимней молодежной школе-конференции по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2020), VII молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020), международной конференции по биотехнологиям и здоровью (Yerevan, Armenia, 2020), международном симпозиуме «Regenerative medicine and ageing» (Dubai, UAE, 2020), XXIII конгрессе с международным участием «Давыденковские чтения. Неврология» (Санкт-Петербург, 2021), X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2021), двадцать пятой Санкт-Петербургской ассамблее молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2022), XV международном форуме «Старшее Поколение» (Санкт-Петербург, 2022), VIII молодежной школе-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2022), на VI междисциплинарной научной конференции с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2022), XXVIII всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2022), на 2-ом и 3-ем семинаре с международным участием «Antimicrobial peptides as prototypes of novel antibiotics» (Санкт-Петербург, 2022-2023), III Санкт-Петербургском геронтологическом форуме «Развитие

Российской геронтологии и приоритеты государственной политики в сфере медико-социальной поддержки граждан старшего поколения» (г. Санкт-Петербург, 2023).

Результаты, представленные в диссертационном исследовании, послужили основанием для признания автора победителем в конкурсе грантов для студентов, аспирантов ВУЗов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, а АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» был дважды удостоен гранта в форме субсидий, предоставляемого Комитетом по науке и высшей школе при Правительстве Санкт-Петербурга на конкурсной основе в сфере научной и научно-технической деятельности.

### **Публикации по теме работы**

По материалам диссертации опубликовано 29 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ для опубликования материалов диссертационных исследований (из них 4 статьи, индексируемые в международных базах Scopus и Web of Science), 3 главы в коллективной монографии и 20 тезисов докладов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 106 страницах, содержит 8 таблиц, иллюстрирован 31 рисунками. Список литературы содержит 117 источников, из них на русском языке – 13, на английском – 104.

### **Личный вклад автора**

Автором составлены план исследования, определены цели и задачи, проанализирована отечественная и зарубежная литература, подготовлен литературный обзор, проведены эксперименты, осуществлен сбор и анализ данных, подготовлены публикации совместно с соавторами. Автором

разработан скрининговый подход, освоены методики генотипирования животных (в т.ч. выделения геномной ДНК, ПЦР и ДНК-электрофореза), транскардиальной перфузии, приготовления фиксированных и переживающих срезов гиппокампа, регистрации полевых потенциалов, анализа полевых потенциалов, морфометрического анализа дендритных шипиков нейронов гиппокампа.

### **Связь с научно-исследовательской работой института**

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану научно-исследовательских работ АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность директору АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» заслуженному деятелю науки РФ, профессору, д.м.н. Рыжак Г.А. за возможность работы над проектом, поддержку и помощь на всех этапах диссертационного исследования.

Автор выражает благодарность заведующему лаборатории молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского государственного политехнического университета Петра Великого, д.б.н., профессору И.Б. Безпрозванному за предоставленную возможность освоения методик и проведения экспериментов по теме диссертационного исследования, а также ценные рекомендации. Сотрудникам лаборатории молекулярной нейродегенерации к.б.н. Красковскую Н.А. и к.ф.-м.н. Ерофеева А.И. за помощь в освоении основных методик, проведении двойного слепого морфометрического анализа дендритных шипиков и регистрации полевых потенциалов в переживающих срезах гиппокампа мышей. Автор благодарит ведущего научного сотрудника отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, доктора физ.-мат. наук

Петухова М.Г. за предоставление нуклеотидных последовательностей, образующих сайты связывания коротких пептидов с ДНК.

Автор выражает благодарность заведующей лабораторией фармакологии пептидов отдела биogerонтологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» д.б.н. Попович И.Г. за конструктивные замечания и поддержку при подготовке диссертационной работы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Болезнь Альцгеймера. Ключевые аспекты патогенеза

Болезнь Альцгеймера (БА) – возраст-ассоциированное нейродегенеративное заболевание, при котором наблюдаются когнитивные нарушения и нервно-психические расстройства [Piaceri I. et al., 2013]. Более 50 миллионов человек страдают деменцией во всем мире. БА чаще возникает после 65 лет (позднее начало), но среди 1%–6% случаев наблюдаются пациенты в возрасте 30 – 65 лет. Только в 1–5% случаев БА являются семейной формой заболевания, преимущественно возникающей в раннем возрасте (моложе 65 лет), тогда как остальные 95-99% относят к спорадическим вариантам, которые у 90% пациентов наблюдаются в возрасте старше 65 лет [Piaceri I. et al., 2013].

В течение 10-15 лет до появления клинических симптомов в патогенезе БА выделяют доклиническую фазу заболевания, которая характеризуется широким спектром молекулярных нарушений, среди которых выделяют мисфолдинг амилоида (A $\beta$ ) и гиперфосфорилирование белка тау ( $\tau$ ), нейровоспаление, окислительный стресс, липидный, углеводный и кальциевый дисбаланс, дисфункцию митохондрий. В целом прогрессирование заболевания сопровождается гибелью нейрональных клеток в первую очередь в структурах головного мозга, ответственных за формирование памяти, а именно – энторинальной коре и гиппокампе. Развитие нейродегенеративных процессов в коре головного мозга приводит к двигательным, пищевым и психофизиологическим нарушениям, среди которых депрессия, тревожность, раздражение и др. [Cronin T. et al., 2017], что негативно сказывается на качестве жизни пациентов и приводит к гибели через 5-12 лет после диагностирования первых симптомов.

О болезни Альцгеймера известно с 1907 г., благодаря немецкому психиатру и неврологу Алоису Альцгеймеру. С тех пор на сегодняшний день известны разные теории развития БА. Наиболее распространенная –

амилоидная теория [Hardy J.A., Higgins G.A., 1992]. Согласно ей мисфолдинг  $\beta$ -амилоида ( $A\beta$ ) способствует развитию нейродегенерации и накоплению  $A\beta$  в виде внеклеточных амилоидных бляшек в головном мозге – основного гистопатологического признака БА [Palmqvist S. et al., 2014; Sun X. et al., 2015].  $\beta$ -амилоид высвобождается при протеолизе предшественника амилоида (APP) в присутствии  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретаз [Thinakaran G., Koо E.H., 2008]. При альтернативном сплайсинге образуется до 10 различных изоформ APP, образованных 563–770 аминокислотными остатками, что, в свою очередь, приводит к образованию различных  $A\beta$ -фрагментов, называемых  $A\beta$  38-42, при протеолизе с участием  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретаз [Bhadbhade A., Cheng D.W., 2012].

Согласно теории токсичных олигомеров ( $A\beta O$ ) [Ferreira-Vieira T.H. et al., 2011], в виду отсутствия стабильной трехмерной структуры при достижении наномолярных концентраций  $A\beta$  агрегирует в неправильно свернутые растворимые пептиды (олигомеры) [Penke V. et al., 2020], что приводит к изменению физиологической активности  $A\beta$  на нейротоксичную [Chen G.F. et al., 2017]. Последняя заключается в активации гиперфосфорилирования белка тау ( $\tau$ ) ассоциированного с микротрубочками, что влечет за собой сплетение нейрофибрилл в виде внутриклеточных нейрофибрилярных клубков (другой гистопатологический признак БА), нарушению цитоскелета нейронов, развитие окислительного стресса, нейровоспаления, ухудшение процессов нейропластичности и гибели нейронов [Michaels T.T. et al., 2020].

Согласно холинергической гипотезе, БА развивается ввиду сниженного синтеза ацетилхолина, что приводит к нарушению холинергической передачи и гибели холинергических нейронов и, как следствие, к когнитивным нарушениям [Sultzer D.L. et al., 2022]. Существует также теория митохондриальной дисфункции (накопление свободных радикалов с последующим окислительным стрессом приводит к патологическому старению по типу БА) [Swerdlow R.H. et al., 2014], теория нейровоспаления, ассоциированного с микроглией (активация микроглии с

последующим выбросом провоспалительных факторов) [Heppner F.L. et al., 2015], теория сосудистой дисфункции (нарушение мозгового кровообращения и эндотелиальных процессов) [Di Marco L.Y. et al., 2015], теория кальциевой дисрегуляции (нарушение в функционировании депо-управляемого входа кальция вызывает дисбаланс кальция внутри клетки, что приводит к развитию воспаления, увеличенной продукции АФК, аутофагии, синаптической и когнитивной дисфункции) [Porugaeva E. et al., 2018].

## **1.2. Изменение морфофункционального состояния нейронных сетей гиппокампа как основа когнитивной дисфункции**

Память человека обусловлена пластичностью мозга (нейропластичностью) – способностью формировать новые и восстанавливать старые нейронные связи. Функциональным компонентом нейропластичности является способность синаптических контактов претерпевать физиологические и морфологические изменения в зависимости от нейрональной активности (синаптическая пластичность). На клеточном уровне функциональной единицей пластичности является нейрональный контакт – синапс, – состоящий из пре- и постсинаптической терминалей и синаптической щели между ними.

Несмотря на то, что образование амилоидных бляшек является основным гистопатологическим признаком развития БА, накопление А $\beta$  слабо коррелирует с развитием когнитивных нарушений [Lue L.-F. et al., 1999]. Напротив, когнитивная дисфункция тесно связана с элиминацией синапсов в гиппокампе [Terry R.D. et al., 1991; Pchitskaya E., Vezprozvanny I., 2020]. В связи с этим в настоящей работе изучали параметры морфофункционального состояния синапсов в мозге мышей линии 5xFAD и использовали их для оценки эффективности потенциальных нейропротекторных пептидов.

### **1.2.1 Функциональные аспекты синаптической пластичности**

Первичные когнитивные нарушения, диагностируемые при БА, связаны с распространением нейродегенеративных процессов в гиппокампе – парной структуре височной области мозга, ответственной за начальные этапы формирования памяти [Sekeres M.J. et al., 2018].

В гиппокампе присутствуют три строго-организованные области с ламинарной структурой (CA3, CA2 и CA1), в рамках которой основными типами клеток являются возбуждающие пирамидные нейроны и ингибирующие интернейроны [Andersen P. et al., 2009]. Пирамидные нейроны CA3 и CA1 областей в совокупности с гранулярными клетками зубчатой извилины (расположена в глубине борозды гиппокампа) образуют нейронную сеть гиппокампа под названием «трисинаптический путь». При этом аксоны пирамидных нейронов CA3 области, проецируясь в область CA1 гиппокампа, являются неотъемлемой частью формирования памяти и носят название коллатералей Шаффера.

Высокоструктурированная организация тормозных интернейронов и возбуждающих пирамидных клеток в гиппокампе обеспечивает возникновение внеклеточных локальных полевых потенциалов (ЛПП) [Buzsáki G. et al., 2012], [Klausberger T., 2009], которые возможно зарегистрировать благодаря синхронизации и суммации трансмембранных токов. Компонентами ЛПП являются популяционный потенциал, полевой ингибирующий постсинаптический потенциал (пИПСП) и полевой возбуждающий постсинаптический потенциал (пВПСП). При суммации синхронно деполяризованных клеток формируется полевой потенциал, амплитуда которого соответствует количеству этих клеток [Korpanitsa et al., 2006].

При изучении механизмов нейротрансмиссии важным аспектом является потенциация синаптической передачи, которая заключается в увеличении деполяризации постсинапса при той же или меньшей деполяризации

пресинапса. При тета-стимуляции коллатералей Шаффера в CA1 области гиппокампа наблюдается долговременная потенция (ДВП) [Larson J. et al., 1986; Grover L.M. et al., 2009; Larson J., Munkácsy E. 2015]. В связи с тем, что при изменении силы синаптических связей происходит закрепление полученной информации [Amtul Z., Atta-Ur-Rahman, 2015], ДВП является функциональным компонентом синаптической пластичности и играет важную роль в процессах обучения и памяти [Segal M., 2017; Chidambaram S.B. et al., 2019]. Олигомерные формы Аβ нарушают ДВП [Serrano-Pozo A. et al., 2011]. ДВП возникает ввиду образования новых рецепторов на постсинапсе, ввиду чего длится дольше 1 ч. Существует также и кратковременная потенция, которая связана с модификациями уже синтезированных белков в пресинапсе, поэтому длится до 30 мин. В соответствии с поставленными задачами диссертационного исследования интерес представляет именно явление ДВП, которое приводит к морфологическим изменениям в структуре синапса [Baltaci S.B. et al., 2019].

Протокол высокочастотной стимуляции (ВЧС, 100 Гц, 1 секунда) [Albensi V.C. et al., 2007], [Baltaci S.B. et al., 2019] в подавляющем большинстве используются для индукции ранней фазы ДВП, которая длится 1-3ч и не связана с синтезом белка.

Формирование ДВП обусловлено следующими молекулярными процессами. Во время стимуляции мембранный потенциал (МП) пресинапса из состояния покоя (-70 мВ) увеличивается до -55мВ, открываются натриевые каналы, внутрь клетки попадает  $\text{Na}^+$ , МП увеличивается до +30 мВ и генерируется потенциал действия (ПД). Далее в пресинапс поступают ионы кальция через потенциал-зависимые каналы, активируется сборка везикул и экзоцитоз глутамата, который на постсинапсе связывается с ионотропными рецепторами AMPA [Baltaci S.B. et al., 2019]. Это способствует постсинаптической деполяризации и освобождению NMDA рецепторов от магния. Глутамат также связывается с NMDAR, в результате чего в

постсинапсе происходит приток  $Ca^{2+}$ , активируется «молекула памяти», кальмодулин-зависимая киназа второго типа (CaMKII), [Baltaci S.V. et al., 2019], которая обеспечивает фосфорилирование белковых субстратов внутри клетки, например AMPAR. Активируются также и фосфатидилинозитол-3 (PI3) – киназа, митоген-активируемая (MAP)-киназа, тирозин- и протеинкиназы. Однако для формирования ранней фазы ДВП не обязательна активация всех киназных систем [Andersen P. et al., 2013]. Ключевым последствием увеличения концентрации внутриклеточного кальция является активация аденилатциклазы и, как следствие, транскрипционного фактора цАМФ-зависимого белок-связывающего элемента (CREB). Это и является молекулярной основой дальнейших морфологических изменений в синапсе.

### **1.2.2 Морфологические аспекты синаптической пластичности**

Спустя более чем 24 ч после начала индукции ДВП активируются транскрипционные факторы, запускается синтез новых белков, что относится к поздней фазе ДВП (П-ДВП) и сопровождается морфологическими изменениями синапсов [Baltaci S.V. et al., 2019].

Постсинаптическими элементами большинства возбуждающих синапсов в ЦНС являются дендритные шипики [Runge K. et al., 2020]. Морфология дендритного шипика отражает функциональные свойства синапса. Долговременная потенция приводит к синтезу новых белковых молекул на мембране дендритного шипика, что обуславливает динамичный характер морфологии дендритных шипиков [Bourne J.N., Harris K.M., 2008]. Постсинаптические элементы синапсов называются дендритными шипиками. Морфология дендритных шипиков зависит от их функциональной активности. В частности, головка шипика участвует в передаче сигнала, что обеспечивается рецепторами и сигнальными молекулами, расположенными в головке шипика, а их «якорем» выступает белок постсинаптической плотности (PSD). При увеличении функциональной нагрузки на шипик увеличивается

количество рецепторов в мембране шипика, что отражается в увеличении постсинаптической плотности шипика и, как следствие, росте головки шипика. Следовательно, в зависимости от морфофункциональных изменений в синапсе выделяют три основных типа шипиков: тонкие, грибовидные и пеньковые [Rodriguez A. et al., 2008].

Диаметр головки грибовидного шипика превышает 0,6 мкм, пеньковый шипик не имеет шейки, а длина тонкого шипика сильно превалирует над диаметром головки ( $<0,6$  мкм) [Hering H., Sheng M., 2001]. Считается, что именно шипики с крупным размером головки являются наиболее функционально активными, обеспечивают долговременные процессы пластичности и консолидации памяти, тогда как дендритные шипики с малыми размерами обеспечивают только приобретение памяти [Chidambaram S.V. et al., 2019]. Показано, что с развитием когнитивных нарушений при БА тесно коррелирует потеря синаптических контактов нейронов гиппокампа, в частности, наиболее функциональных шипиков грибовидного типа [Terry R.D. et al., 1991].

Таким образом, электрофизиологические процессы, лежащие в основе передачи нервного сигнала в синапсах, отражают функциональную активность нейронов и приводят к морфологическим изменениям дендритных шипиков, что в целом определяет морфофункциональную характеристику нейронной сети гиппокампа, оценка которой имеет принципиальное значение для изучения процессов обучения и памяти в норме и при нейродегенерации.

### **1.3. Возрастные особенности моделирования болезни Альцгеймера у мышей линии 5xFAD**

В качестве основной модели БА выбрана трансгенная линия мышей 5xFAD [Jawhar S. et al., 2012], в геноме которой присутствуют 5 мутаций (расположены в двух трансгенных вставках: человеческие гены белка APP с

Swedish K670N / M671L, Florida I716V, London V717I, и белка PSEN1 с M146L и L286V), связанных с развитием БА семейной формы.

Мутации в гене белка APP приводят к увеличению продукции амилоида, а мутации в гене белка PSEN1 изменяют нормальную функциональную активность секретазы  $\gamma$ , что также способствует усилению образования A $\beta$ 42 [Oakley H. et al., 2006].

Патогенез БА у мышей трансгенной линии 5xFAD с возрастом развивается следующим образом: 10 недель – изменение ДВП в зубчатой извилине [Li N. et al., 2019], 1,5–2 мес – внутриклеточные скопления амилоида, 2–3 мес – внеклеточное скопление A $\beta$ 42 и формирование амилоидных бляшек, с 2 мес – активация микроглии и развитие нейровоспаления, 4 мес – снижение уровня синаптофизина (пресинаптический маркер), 4-6 мес – изменение синаптической пластичности в CA1 области гиппокампа [Crouzin N. et al., 2013; Porugaeva E. et al., 2019; Wang M. et al., 2019], 4-5 мес – нарушение пространственной памяти в Y-лабиринте (с 6 мес – в лабиринте Морриса [Xiao N.A. et al., 2015]) [Oakley H. et al., 2006], с 6 мес – гибель нейронов в V слое коры и субикулуме [Eimer W.A., Vassar R., 2013], 9 мес – снижение уровня синтаксина (пресинаптический маркер), PSD-95 (постсинаптический маркер), двигательные нарушения [O’Leary T.P. et al., 2018]. Экспрессия трансгенов APP и PSEN находится под контролем нейронального промотора Thy-1, который содержит элемент, чувствительный к эстрогену [Feng G. et al., 2000]. Это приводит к тому, что амилоидоз более выражен у мышей-самок [Sadleir K.R., et al., 2018].

Подводя итог приведенным данным, следует отметить, что благодаря наличию мутаций Swedish K670N / M671L, Florida I716V, London V717I, M146L и L286V у мышей 5xFAD наблюдается повышенный уровень токсичного A $\beta$ 42, при накоплении которой внутри и внеклетки развивается синаптическая дегенерация, что приводит к изменению синаптической передачи и, как следствие, нарушению памяти.

Выбор линии мышей 5xFAD в качестве модели БА обусловлен наиболее высокой корреляцией когнитивных нарушений с синаптической дегенерацией и гибелью нейронов, что, в свою очередь, согласуется с течением БА у пациентов на ранних стадиях.

## **1.4. Фармакотерапия болезни Альцгеймера: современные представления и перспективы**

### **1.4.1. Мировой опыт разработки фармакотерапии БА**

В 2023 год на сайте Alzforum наблюдается 107 соединений активных в отношении метаболизма  $A\beta$  и белка  $\tau$ .

При рассмотрении  $A\beta$  в качестве фармакологической мишени разработаны различные соединения по механизму действия, а именно ингибиторы  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретаз, активаторы  $\alpha$ -секретазы, ингибиторы агрегации  $A\beta$  и иммунотерапия. Применение активаторов  $\alpha$ -секретазы, Bryostatin и Acitretin, приводило к развитию гипертонии и тревожности у пациентов с БА [Endres K. et al., 2014]. В исследованиях ингибиторов  $\beta$ -секретазы, проводимых с 2011 по 2020 гг. не обнаружено положительных результатов, что, вероятно, связано с повсеместной экспрессией данного фермента и вовлеченностью в ключевые физиологические функции [<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186318-BACE1>].

При изучении ингибиторов  $\gamma$ -секретазы было продемонстрировано снижение уровня  $A\beta$  в плазме и спинномозговой жидкости здоровых испытуемых [Qiu R. et al., 2016]. В 2018 году работы были прекращены ввиду высокого уровня побочных эффектов и синдрома ARIA-E (отек мозга), что может быть обусловлено участием  $\gamma$ -секретазы в функционировании ключевого сигнального пути Notch.

Применение ингибитора агрегации  $A\beta$  способствовало снижению воспаления в спинномозговой жидкости, улучшению рабочей памяти и внимания у пациентов на ранней стадии БА [Scheltens P. et al., 2018].

При иммунотерапии в рамках активной вакцинации применение препарата UB-311 (два синтетических пептида, мишень которых – A $\beta$ 1-14), улучшало когнитивные функции пациентов с БА, но и способствовало развитию серьезных побочных эффектов [Lacosta A.M. et al., 2018], включая развитие синдрома ARIA-E [Winblad B. et al., 2014].

В рамках стратегии пассивной вакцинации препараты Solanezumab, Ponezumab и Octagam<sup>®</sup> 10% не продемонстрировали эффективность в условиях БА [Betschel S.D. et al., 2016], моноклональные антитела Aduhelm и Lecanemab, были одобрены в США для лечения БА, однако следует отметить, что до сих пор не решен вопрос побочных эффектов в рамках такой стратегии [Cummings J., 2023].

При нацеливании на метаболизм белка  $\tau$  рассматривается ингибирование клиренса и агрегации белка, регуляция пост-трансляционных модификаций (ацетилирование и фосфорилирование), активная и пассивная иммунизация против белка  $\tau$ , регуляция стабилизации микротрубочек. Прослеживаются перспективы побочных эффектов при применении данных соединений. К примеру, активаторы протеинфосфатаз и ингибиторы киназ имеют широкий спектр субстратов и вовлечены в ключевые сигнальные пути [Gao Y. et al., 2018]. На 2023 г. отсутствует эффективное и безопасное соединение для лечения БА, нацеленное на метаболизм  $\tau$  белка.

За последние 30 лет рассматривались и другие гипотезы развития БА, и в соответствии с ними выявлены фармакологические мишени для терапии заболевания. Так, к примеру, для усиления холенэргической передачи использовали такрин, донепезил, ривастигмин, галантамин как ингибиторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Их действие заключается в ингибировании деградации и накоплению ацетилхолина в синапсах. Ввиду высокой гепатотоксичности такрин был снят с производства, а донепезил, ривастигмин, галантамин в настоящее время используются для симптоматического лечения БА, но обладают побочными эффектами [Santaguida P.S. et al., 2004].

В рамках регуляции глутаматэргической нейротрансмиссии для лечения БА средней и тяжелой степени используется мемантин, у которого также выявлен широкий спектр побочных эффектов [Santaguida P.S. et al., 2004].

Таким образом, на мировой арене до сих пор не выявлено эффективное и безопасное соединение для терапии БА.

#### **1.4.2. Пептидные биорегуляторы – перспективные нейропротекторы**

Соединения пептидной природы являются перспективными нейропротекторами ввиду их физиологической активности и низкой иммуногенности. Семейство пептидных биорегуляторов включает полипептидные комплексы из органов крупного рогатого скота и короткие синтетические пептиды. Различие заключается в том, что биологический эффект синтетических пептидов достигается при низких концентрациях в отличие комплексов [Хавинсон В.Х. и др., 2018].

*Пептид AEDG (Ala-Glu-Asp-Gly)* синтезирован на основе анализа аминокислотного состава полипептидного комплекса эпифиза. В пинеалоцитах тетрапептид регулирует выброс секреторных гранул [Сибаров Д.А. и др., 2002], увеличивает синтез транскрипционного фактора pCREB и арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы, обеспечивающих синтез мелатонина [Хавинсон В.Х. и др., 2012], что обуславливает способность пептида AEDG восстанавливать низкий уровень секреции мелатонина у старых обезьян *Macaca Mulatta* [Khavinson V. Kh. et al., 2001]

Пептид AEDG является перспективным для лечения БА, так как у пациентов наблюдается нарушение цикла сон-бодрствование. Было выявлено, что тетрапептид увеличивает синтез белка транстиретина (TTR) в клетках пигментного эпителия сетчатки. TTR расщепляет амилоид и, тем самым защищает нейроны головного мозга от его токсичности [Khavinson V.Kh. et al., 2014].

**Пептид EDR (Glu-Asp-Arg)** синтезирован на основе анализа аминокислотного состава полипептидного комплекса, выделенного из коры головного мозга телят. У макак *Macaca Mulatta* трипептид способствовал улучшению избирательного внимания и пространственной ориентации в процессе обучения выбору визуальных стимулов [Кузнецова Т.Г. и др., 2019]. У пчел *Aris mellifera L.* пептид EDR модулировал ассоциативную деятельность и нормализовывал кратковременную память при формировании условного рефлекса [Хавинсон В.Х. и др., 2021]. Выявлено, что пептид EDR способствовал увеличению синтеза серотонина и виментина в органотипической культуре клеток коры головного мозга крыс линии Вистар [Хавинсон В.Х., 2020]; модулировал синтез белков пролиферации и апоптоза (Ki67, p53, caspase-3) в нейронах и оказывал антиоксидантное действие, снижая уровень активных форм кислорода [Khavinson V. et al., 2011], [Arutjunyan A. et al., 2012]. В условиях амилоидной синаптотоксичности (*in vitro* модель БА) пептид EDR способствует увеличению грибовидных шипиков на дендритах нейронов [Kraskovskaya N.A. et al., 2017].

У лиц пожилого возраста пероральное применение пептида EDR улучшало психоэмоциональный статус, у больных с отдаленными последствиями черепно-мозговой травмы применение трипептида снижало выраженность головной боли, улучшало память и внимание [Хавинсон В.Х., 2020].

**Пептид KE (Lys-Glu)** был синтезирован на основе аминокислотного анализа полипептидного комплекса, выделенного из тимуса молодых телят. Было выявлено, что в лимфоидных клетках пептид KE стимулировал синтез мРНК цитокина IL-2 [Khavinson V.Kh., Malinin V.V., 2005]; в условиях стрессорного воздействия снижал уровень спонтанной клеточной гибели, повышал пролиферативный потенциал и усиливал резистентность клеток к неблагоприятным условиям внешнего микроокружения, тем самым способствуя регенерации тканей [Хавинсон В.Х. и др., 2014]. Пептид KE

может быть перспективен для терапии БА ввиду иммунопротекторного действия.

**Пептид KED (Lys-Glu-Asp)** синтезирован на основе анализа аминокислотного состава полипептидного комплекса, выделенного из сосудов телят. Тетрапептид повышает резистентность и проницаемость капилляров сосудов крыс [Ткаченко Т.Б., 1999], предотвращает перекисное окисление липидов плазмы крови человека [Козина Л.С. и др., 2008], стимулирует синтез белков Ki67, Cx43, VEGF в диссоциированных клетках сосудов, усиливая пролиферацию клеток [Хавинсон В.Х. и др., 2021]. В культуре клеток коры головного мозга пептид KED регулирует экспрессию генов *SUMO1* и *APOE*, ассоциированных с развитием БА [Хавинсон В.Х. и др., 2012]. В условиях амилоидной синаптотоксичности (*in vitro* модель БА) трипептид способствует увеличению дендритных шипиков грибовидного типа [Kraskovskaya N.A. et al., 2017].

У лиц в возрасте 20–75 лет, работающих во вредных производственных условиях, применение пептида KED совместно с пептидом EDR улучшало память и внимание, а также способствовало повышению работоспособности [Башкирева А.С., Артамонова В.Г., 2012]. У лиц пожилого возраста комплексное применение трипептидов способствовало улучшению нейрофизиологического состояния ЦНС, психоэмоционального состояния и памяти [Хавинсон В.Х., 2020].

### **1.5. Подходы для первичного скрининга фармакотерапевтических агентов**

В разработке лекарственных средств выявление молекулярных мишеней является главным приоритетом при оценке их потенциальной эффективности. Показано, что 25% доклинических и 48% клинических исследований компании AstraZeneca прекращено по причинам, связанным с идентификацией мишеней [Cook D. et al., 2014]. Соответственно, проблема

корректного выбора потенциальных мишеней действия разрабатываемых терапевтических соединений остается актуальной.

С развитием биоинформатики, химической информатики и омикс-технологий на первый план вышли компьютерные методы обнаружения терапевтических мишеней (методы *in silico*). Интегрируя большие данные с вычислительными методами, компьютерное обнаружение терапевтических мишеней значительно сокращает объем молекул, тестируемых *in vitro* и *in vivo*, что сокращает цикл открытия и разработки лекарств и снижает стоимость эксперимента [Zhang X. et al., 2022].

В настоящее время одними из самых современных вычислительных подходов к идентификации терапевтических мишеней, соединяющим сетевую фармакологию, сетевую медицину, сетевую биологию, системную биологию и данные мультиомики, являются сетевые методы. Объединяя анализ путей и концепцию теории сетевых графов, сетевые стратегии не только фокусируются на взаимодействиях (ребрах) между отдельными молекулами (узлами) и координированными путями, но и позволяют проводить систематическое визуальное исследование биологических (или биомедицинских) сетей для выявления функциональных компонентов [Jain V. et al., 2018].

Основная концепция сетевых методов заключается в отображении всех соответствующих данных в визуальную сеть. Высокосвязанные узлы (центральные узлы), которые действуют как мосты между последовательными сетевыми компонентами в одной сети, прогнозируются как основные белки или гены патогена (или биологического процесса) и показывают, что они связаны с модульной структурой физической и функциональной сети взаимодействия. Такие узлы предположительно являются идеальными терапевтическими мишенями в сети, поскольку они поддерживают целостность сети [Csermely P. et al., 2013].

Сети могут быть построены на основе взаимодействия белок-белкового взаимодействия (PPI), взаимодействия генов и сети взаимодействия miRNA-мРНК [Zhang X. et al., 2022]. В рамках настоящей работы интерес представляют сети белок-белковых взаимодействий, для построения которых входными данными служат последовательности генов – потенциальных мишеней связывания коротких пептидов.

Преимуществом сетевых методов построения белок-белковых сетей является отображение не только классических пространственных взаимодействий, но также и молекул, не соприкасающихся между собой, например, когда фактор транскрипции помогает регулировать экспрессию и выработку другого белка или, когда два фермента обмениваются определенным субстратом посредством диффузии. Этот факт в контексте сетевых методов расширяет термин «взаимодействие» до понимания того, что взаимодействия могут быть ограничены не только определенными типами клеток или определенными физиологическими состояниями, но их специфичность и сила также могут варьироваться, от обязательных, высокоспецифичных и стабильных связываний до более мимолетных и относительно неспецифичных «встреч» [Szklarczyk D. et al., 2019].

Одной из самых первых баз данных, позволяющих конструировать белок-белковые сети, является веб-ресурс STRING, насчитывающий на 2024 год более 24 миллиона белков [Szklarczyk D. et al., 2019]. Базовой единицей взаимодействия в STRING является «функциональная ассоциация», т. е. связь между двумя белками, которые оба совместно вносят вклад в определенную биологическую функцию [Snel B. et al., 2002]. Для того, чтобы два белка были связаны таким образом, им не нужно взаимодействовать физически. Вместо этого достаточно, чтобы хотя бы часть их функциональных ролей в клетке перекрывалась, и эта перекрывающаяся функция должна быть достаточно специфичной, чтобы в целом квалифицироваться как путь или функциональная карта. Согласно этому определению, даже белки, которые

антагонизируют друг друга, могут быть функционально связаны, например, ингибитор и активатор в пределах одного и того же пути. С точки зрения выявления потенциальных мишеней данный факт крайне важен для понимания широты действия пептидов и/или потенциальных побочных эффектов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование в рамках задачи 1 выполнено в лаборатории молекулярных механизмов старения Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии; задачи 2-5 выполнены в лаборатории молекулярной нейродегенерации (заведующий лабораторией, профессор, д.б.н. И.Б. Безпрозванный) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

### 2.1. Базы данных

В соответствии с теорией пептидергической регуляции [Morozov V.G.; Khavinson V.Kh., 1997], одним из потенциальных механизмов, лежащих в основе биологических эффектов коротких пептидов, является их связывание с промоторными участками генов, вовлеченных в биологические процессы, и, как следствие, изменение экспрессии этих функциональных генов. В связи с этим нами было сделано предположение, что данный механизм может также обуславливать нейропротекторные эффекты пептидов при БА.

В качестве перспективных нейропротекторов пептидной природы рассматривали ди-, три- и тетрапептиды. В частности, на основании результатов предыдущих экспериментов и выявленной биологической активности, что отражено в обзоре литературы, для первичного скрининга были выбраны пептиды KE, EDR, KED, AEDG.

Исходными данными для настоящего исследования являлись нуклеотидные последовательности – сайты связывания коротких пептидов с ДНК, полученные ведущим научным сотрудником лаборатории биофизики макромолекул ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, д.ф.-м.н. Петуховым М.Г. (табл. 1).

Нуклеотидные последовательности – сайты связывания коротких пептидов с ДНК.

Пептид	Последовательность ДНК	ICM-Score
KE	TCGA	-35,8
EDR	TTGC	-52,5
KED	TTAGGG	-31,7
AEDG	TTCCCGGC	-33,3

*Примечание:* ICM-Score – оценка связывания

В связи с тем, что при докинге низкомолекулярных лигандов приемлемой для высокоэффективного связывания является величина ICM-Score  $\leq -32$  [Neves M.A. et al., 2012; Abagyan R. et al., 2018], прогнозирование биологических мишеней было проведено только для пептидов KE, EDR и AEDG, допуская тот факт, что потенциальный механизм, обуславливающий действие пептида KED, отличается от взаимодействия с промоторными участками ДНК и может быть опосредован взаимодействием с гистонами или другими функциональными молекулами (транскрипционных факторов, малых некодирующих РНК и др.).

Поиск промоторных последовательностей генов человека осуществляли в The Eukaryotic Promoter Database (EPD). Database URL: <http://www.epd.isb-sib.ch> [P erier R.C. et al., 2000]. Гены, ассоциированные с развитием БА, определяли с помощью базы данных биологических путей человека PathCards (Pathway Unification database, database URL: <http://pathcards.genecards.org/>) [Belinky F. et al., 2015]. Для выявления взаимосвязи между белками использовали базу данных STRING ('Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins' 11.0, database URL: <https://string-db.org/>) [Szkarczyk D. et al., 2019]. Визуализацию взаимосвязи белков, ассоциированных с развитием БА, осуществляли с использованием базовых параметров: (i) full STRING network;

(ii) active interaction sources (Textmining, Neighborhood, Experiments, Gene Fusion, Databases, Co-occurrence, Co-expression); (iii) medium confidence (0,4); (iiii) no interactors on the first and the second shells.

Для визуализации сети белков, кодируемых генами-мишенями для коротких пептидов, сеть насыщали при условии «50 interactors on the first and no on the second shells» [Feltes B.C. et al., 2020]. Для оценки функционального обогащения белок-белковых взаимодействий (PPI) с помощью терминов геной онтологии (GO) использовали кластерный алгоритм Маркова (MCL) с параметрами: inflation parameter – 3, minimum required interaction score – 0.4, the PPI enrichment p-value<0,05. Рассматривали кластеры, состоящие больше, чем из 4 белков.

Для количественного анализа и построения диаграмм использовали программы Excel 2016, GraphPad Software, BioRender tool.

## 2.2. Животные

Исследование проведено с использованием следующих линий мышей:

- трансгенной линии 5xFAD, поступившей из Jackson Laboratory (США);
- линии дикого типа B6SJL (WT), не несущей трансгенных элементов, поступившей из Jackson Laboratory (США);
- трансгенной линии Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J (M), поступившей из Jackson Laboratory (США).

В экспериментах проводили манипуляции, не предполагающие вынос животных из вивария (группа А) и терминальные процедуры вне зоны вивария (группа Б). К манипуляциям группы А относили скрещивание, генотипирование, а также внутрибрюшинное введение испытуемых препаратов и физиологического раствора. К манипуляциям группы Б относили транскардиальную перфузию с предварительным введением наркоза и последующим извлечением мозга животного. Все манипуляции с животными

соответствовали положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), а также принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с лабораторными животными (1996).

### **2.3. Определение генотипа мышей**

Генотип животных определяли с помощью выделения геномной ДНК из кончика хвоста мыши, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ДНК-электрофореза.

#### **2.3.1. Выделение геномной ДНК методом фенол-хлороформной экстракции**

Геномную ДНК мышей выделяли из кончика хвоста с применением буфера для лизиса клеточных и ядерных мембран (SNET-буфер: 400 mM NaCl, 5 mM динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na<sub>2</sub>EDTA), 20 mM трис(гидроксиметил)аминометан (Tris)-HCl, 1% додецилсульфат натрия (SDS), pH=8,0) в присутствии протеиназы-K (10 мг/мл) в течение 12 ч при температуре 37°C, после чего образцы центрифугировали 10 мин со скоростью 14000 об/мин при комнатной температуре с добавлением 160 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1). Для ПЦР использовали верхнюю водную фазу, которую отделяли и хранили при температуре +4°C.

#### **2.3.2. Полимеразная цепная реакция**

ПЦР реакция содержала следующие компоненты: вода стерильная (доводится объем до 24 мкл), 10-кратный буфер для Taq-полимеразы 2,5 мкл, 10мМ смесь дезоксинуклеозид-трифосфатов 0,5 мкл, 1,5 мкл 25мМ MgCl<sub>2</sub>, каждый праймер по 0,125 мкл, Taq-полимераза 0,25 мкл, ДНК 1мкл. Праймеры, использованные для генотипирования мышей, следующие: для

трансгена *APP* – F: *AGGACTGACCACTCGACCAG*, R: *CGGGGGTCTAGTTCTGCAT*, для трансгена *PSEN1* – F: *AATAGAGAACGGCAGGAGCA*, R: *GCCATGAGGGCACTAATCAT*, для трансгена *GFP* – F: *ACAGACACACACCCAGGACA*, R: *CGGTGGTGCAGATGAACTT*, положительный контроль – F: *CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT*, R: *GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC*. Реакцию, состоящую из пяти стадий (I. Первичная денатурация, II. Денатурация, III. Отжиг праймеров, IV. Элонгация, V. Конечное удлинение цепи), проводили на амплификаторе Thermo cycler C1000 компании Bio Rad (USA), по следующим программам: для амплификации трансгена *PSEN1*: I. 95 °C, 180 мин; II. 95 °C, 30 мин; III. 54 °C, 60 мин; IV. 72 °C, 130 мин; V. 72 °C, 600 мин; для амплификации трансгена *APP*: I. 95 °C, 180 мин; II. 95 °C, 30 мин; III. 52 °C, 60 мин; IV. 72 °C, 60 мин; V. 72 °C, 600 мин; для амплификации трансгена *GFP*: I. 94 °C, 180 мин; II. 94 °C, 30 мин; III. 65 °C, 60 мин; IV. 68 °C, 60 мин; V. 68 °C, 600 мин. Стадии III-V повторяли 34 раза.

### 2.3.3. Электрофорез ДНК

В геле из 1% агарозы и трис-ацетатного буфера проводили электрофорез ДНК с добавлением интеркалирующего красителя GelRed (Biotium, США) в пробы, разделение которых верифицировали на ультрафиолетовом трансиллюминаторе (Vilberlourmat, ECXF15.M). Мышей линии 5xFAD считали трансгенами, если по результатам электрофореза обнаружены две полосы (600 и 300 п.о.) в пробах после амплификации трансгена *PSEN1* и одной полосы (350 п.о.) в пробах после амплификации трансгена *APP*. Мышей линии 5xFAD-M считали трансгенами, если помимо указанных результатов амплификации трансгенов *PSEN1* и *APP* в ходе электрофореза была также выявлена полоса на уровне 415 п.о.

## **2.4. Перфузия**

Транскардиальную перфузию проводили предварительно внутрибрюшинно анестезированным животным: 250 мг/мл уретан в 0,9% NaCl (Sigma-Aldrich, США) – для морфологического анализа, смесь 40 мкл [Zoletil® Virbac] + 150 мкл [NaCl+Ксила] + 160 мкл 0,9% NaCl – для электрофизиологического исследования. Перфузию осуществляли охлажденным PBS со скоростью 3 мл/мин. По окончании перфузии декапетировали мышь, извлекали головной мозг, который хранили в течение суток в 4% фосфатно-солевом растворе параформальдегида (PFA/PBS) при температуре +4 °С, после чего готовили фиксированные срезы головного мозга.

Раствором иСМЖ с NMDG проводили перфузию для приготовления переживающих срезов головного мозга. Извлеченный мозг фиксировали на подложке в ванночке вибротома, которая была заполнена охлажденным карбогенируемым раствором иСМЖ с NMDG.

## **2.5. Электрофизиологические методы исследования**

Синаптическую пластичность в мозге мышей при БА изучали методом регистрации пВПСП. Для этого проводили транскардиальную перфузию у мышей, извлекали головной мозг, получали переживающие срезы гиппокампа, индуцировали ДВП, регистрировали и количественно оценивали полевые ответы.

### **2.5.1. Приготовление переживающих срезов гиппокампа**

Для приготовления переживающих срезов проводили транскардиальную перфузию предварительно анестезированных животных с применением раствора иСМЖ с NMDG (№1) при температуре +4°С. Далее извлекали головной мозг и с помощью вибротома (VT1000S; Leica, Франция) в присутствии карбогенируемого раствора №1 при температуре 0°С получали

горизонтальные срезы мозга мыши толщиной 400 мкм, на которых выделяли гиппокамп, располагали и инкубировали его в течение 1 ч в резервуаре с карбогенируемым раствором №2 при температуре +35 °С, после чего переносили и инкубировали в течение 10 мин в экспериментальной камере с карбогенируемым раствором №3 (скорость перфузии – 5 мл/мин).

Состав растворов №1, №2, №3 отработан в соответствии с [Aghajanian G.K., Rasmussen K., 1989], [Feliciano P., Andrade R., Vykhovskaia M., 2013]. [Ting J.T. et al., 2018], [Xiong et al., 2017] и представлен следующим образом. **Раствор uCMЖ №1** с NMDG: 92mM NMDG; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 mM NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM HEPES; 25 mM D-glucose; 2 mM Thiourea; 5 mM Na-ascorbate; 3 mM Na-pyruvate; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>. **Раствор uCMЖ №2** (pH 7,3 – 7,4): 92 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 mM NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM HEPES; 25 mM D-glucose; 2 mM Thiourea; 5 mM Na-ascorbate; 3 mM Na-pyruvate; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 2 mM MgSO<sub>4</sub>. **Раствор uCMЖ №3** (pH 7,3 – 7,4): 119 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 24 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5 mM HEPES; 12,5 mM D-glucose; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 2 mM MgSO<sub>4</sub>.

### 2.5.2. Стимуляция и регистрация полевых потенциалов

Стимуляцию коллатералей Шаффера осуществляли в области substratum radiatum на границе полей CA2 и CA1 гиппокампа импульсами по 20 с, 0,033 Гц, 10 – 300 мкА (шаг 10 мкА).

Силу тока подбирали при такой амплитуде пВПСП, которая составляла 40-50% от той [Tetteh H. et al., 2019], которая сопровождалась возникновением популяционного спайка (рис. 1), характеризующего постсинаптический популяционный потенциал. В отсутствии последнего устанавливали силу тока при максимальной и стабильной амплитуде пВПСП [Mathis D.M. et al., 2011].

пВПСП регистрировали в течение 20 мин, что было принято за базовый ответ. Далее индуцировали ДВП с помощью протокола ВЧС 100 Гц.

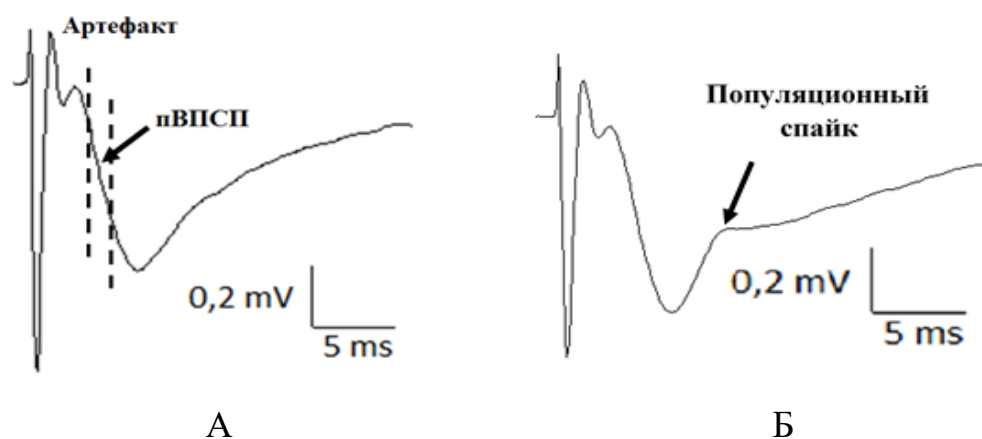


Рисунок 1 – Пример зарегистрированного пВПСП. А – линейный сегмент восходящей фазы пВПСП, Б – популяционный спайк.

Двойная закрученная нихромовая нить диаметром 0,07 мм (A-M System, USA) служила в качестве стимулирующего электрода. Регистрирующий электрод представлял собой стеклянный микроэлектрод (0,2–0,3 МОм), заполненным раствором №3 [Orr A.L., Clark J.K., Madison D.V., 2019]. пВПСП регистрировали в программе Clampex программного пакета pClamp 10.7 (Molecular devices, США) при помощи усилителя Multiclamp 700B (Molecular devices, США) и цифрового преобразователя Digidata 1440A series (Molecular devices, США). Усилителем управляли с помощью программы MultiClamp™ Commander.

### 2.5.3. Количественный анализ

Количественный анализ данных проводили в программе Clampfit 10.2 («Axon Instruments», США). Параметром, характеризующим синаптическую пластичность, являлся угол наклона линейного сегмента восходящей фазы пВПСП (slope), который характеризует скорость передачи импульса по коллатералям Шаффера к пирамидальным клеткам CA1 области гиппокампа [Andersen P. et al., 1971; Aitken P.G., 1985; Balestrino M., et al., 1986; Urban L. et al., 1989]. Значение slope после индукции ДВП нормировали относительно

базовых [Reyes-Garcia S.Z. et al., 2018]. Для оценки ДВП определяли slope спустя 50 мин после индукции ДВП [Lynch G. et al., 2007].

## **2.6. Морфологическая характеристика нейрональных контактов**

Для морфологической характеристики дендритных шипиков мышей подвергали транскардиальной перфузии в присутствии параформальдегида, извлекали головной мозг, готовили фиксированные срезы головного мозга и с помощью конфокальной микроскопии получали микрофотографии вторичных апикальных дендритов для дальнейшего морфометрического анализа.

### **2.6.1. Приготовление фиксированных срезов мозга**

Фиксированные срезы головного мозга толщиной 40 мкм изготавливали на вибротоме (Lancer, США) в присутствии PBS, хранили в 24-луночном планшете в растворе 0,5% забуференного PFA, заключали в среде Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc. Cat# 18606, США) для дальнейшего морфометрического анализа.

### **2.6.2. Морфометрический анализ**

С применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа ThorLabs получали серии микрофотографий-срезов при 100-кратном увеличении (Olympus UPlanSApo) с разрешением 1024×1024, толщина среза – 0,2 мкм/пиксель, толщина серии срезов – 4-8 мкм. От каждой мыши было получено 10 микрофотографий нейронов CA1 области гиппокампа.

Перед проведением морфологического анализа было необходимо оценить распределение GFP в нейронах гиппокампа мышей линии 5xFAD-M, так как в случае неравномерного распределения некорректно судить о морфологии структур. Для этого с помощью программного обеспечения ImageJ в относительных единицах измерения (arbitrary unit – a.u.) определяли

интегративную плотность (ID), которая представляет собой сумму значений пикселей изображения и эквивалентно произведению площади и среднего значения серого.

Перед морфометрическим анализом в программном обеспечении Huygens получали функцию рассеяния точки (PSF), которую использовали для деконволюции изображений по алгоритму Ричардсона-Люси в программном обеспечении Image J с использованием плагина DeconvolutionLab. Морфометрический анализ дендритных шипиков проводили в программном обеспечении NeuronStudio согласно статье [Rodriguez A., et al., 2008] и следующими параметрами: минимальный размер пенькового шипика (min stubby size) – 10, непенькового (non-stubby) – 10, отношение размеров головки шипика к шейке (neck ratio) – 1,3, соотношение сторон для тонкого шипика (thin ratio) – 2,5, размер грибовидного шипика (mushroom size) – 0,35. Количественно определяли отношение общего количества шипиков к 10 мкм длины дендрита (плотность дендритных шипиков, DSD) и относительное количество шипиков каждого типа: грибовидных (MS), тонких (TS) и пеньковых (SS) шипиков.

## 2.7. Статистический анализ

Данные анализировали в программных обеспечениях Microsoft Excel, Clampfit, Statistica 12 и GraphPad Prism.

При исследовании влияния трипептидов на нейропластичность в связи с малым размером выборок для выявления статистически значимых различий между группами использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса и критерий Манна-Уитни. Для выявления тенденции изменения нейропластичности в группах использовали S-критерий тенденций Джонкхира.

При исследовании влияния трипептидов на морфологию дендритных шипиков нейронов при БА полученные выборки удовлетворяли критериям

нормального распределения (критерий Шапиро-Уилка,  $p > 0,05$ ). Для выявления статистически значимых различий между двумя выборками использовали t-критерий Стьюдента, между более чем 2-мя выборками – использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим применением критерия Даннета в качестве апостериорного теста. Во всех исследованиях уровень значимости ( $\alpha$ ) принимали равным 0,05. При этом результаты считали достоверными, если вероятность ( $p$ ) нарушения гипотезы об отсутствии различий между выборками была меньше уровня значимости  $\alpha$ . В данном случае, при  $p \leq 0,05$ . Результаты представлены в виде медианы (межквартильного интервала) или среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **3.1. Разработка подхода по прогнозированию биологических мишеней нейропротекторного действия коротких пептидов при болезни**

#### **Альцгеймера у человека**

##### **3.1.1. Дизайн разработки**

Проведение экспериментов *in vitro* для выявления молекулярных механизмов является классическим подходом в доклинических исследованиях, который требует колоссальных затрат времени и ресурсов. Современные методы биоинформатики позволяют провести скрининговый анализ *in silico* с целью прогнозирования биологической активности потенциально эффективных соединений, что может являться менее затратным отправным этапом в планировании доклинических исследований.

С помощью анализа баз данных, основанных на биоинформатических подходах, а также с применением результатов молекулярного моделирования был разработан подход для прогнозирования биологических мишеней, определяющих нейропротекторное действие коротких пептидов при БА у человека.

Подход по прогнозированию биологических мишеней нейропротекторного действия коротких пептидов при БА у человека заключался в следующем.

На первом этапе определяли гены, ассоциированные с развитием БА, строили сети взаимодействий между их белковыми продуктами и в ходе кластерного анализа проводили разделение белков на кластеры в зависимости от их функциональных характеристик. Далее выявляли принадлежность сайтов связывания пептидов KE, EDR, AEDG к промоторным зонам генов в геноме человека. Выявление этой принадлежности позволило считать эти гены потенциальными мишенями для связывания пептидов. Затем выявляли гены, принадлежащие двум сформированным совокупностям, а именно гены, промоторы которых являются потенциальными мишенями для связывания

пептидов и которые вовлечены в развитие БА. Далее строили сети белок-белковых взаимодействий и проводили кластерный анализ функциональной взаимосвязи между этими белками, кодируемыми БА-ассоциированными генами, промоторы которых являются потенциальными мишенями связывания пептидов. В ходе реализации подхода выявляли наиболее перспективное соединение для тестирования *in vivo* в качестве потенциального терапевтического агента для лечения БА.

### 3.1.2. Реализация подхода

На первом этапе сформировывали совокупность генетических мишеней, вовлеченных в развитие БА (этап 1). Для этого с помощью базы данных Pathcards было выявлено 369 генов, вовлеченных в развитие БА (рис. 2, 3). С помощью базы данных STRING Белковые продукты 366 генов включены в 12 кластеров, характеризующихся следующими терминами генной онтологии (GO): 0006119 Окислительное фосфорилирование, 0042981 Регуляция апоптоза / 0034599 Клеточный ответ на окислительный стресс, 0043687 Пост-трансляционные модификации белков, 0034205 Формирование бета-амилоида / 0006629 Метаболизм липидов, 0016055 Сигнальный путь Wnt, 0007017 Процессы, ассоциированные с микротрубочками, 0006914 Аутофагия, 0019722 Кальциевый сигналинг, 0014065 Сигнальный путь PI3K / GO:0046326 Регуляция транспорта глюкозы. Следует подчеркнуть, что здесь указаны лишь ключевые процессы, с которыми связаны выявленные гены и белки. Доля белков в каждом кластере отображена на рисунке 3. Белки образующие кластеры менее чем из 4 элементов, не рассматривались с точки зрения функциональной взаимосвязи.

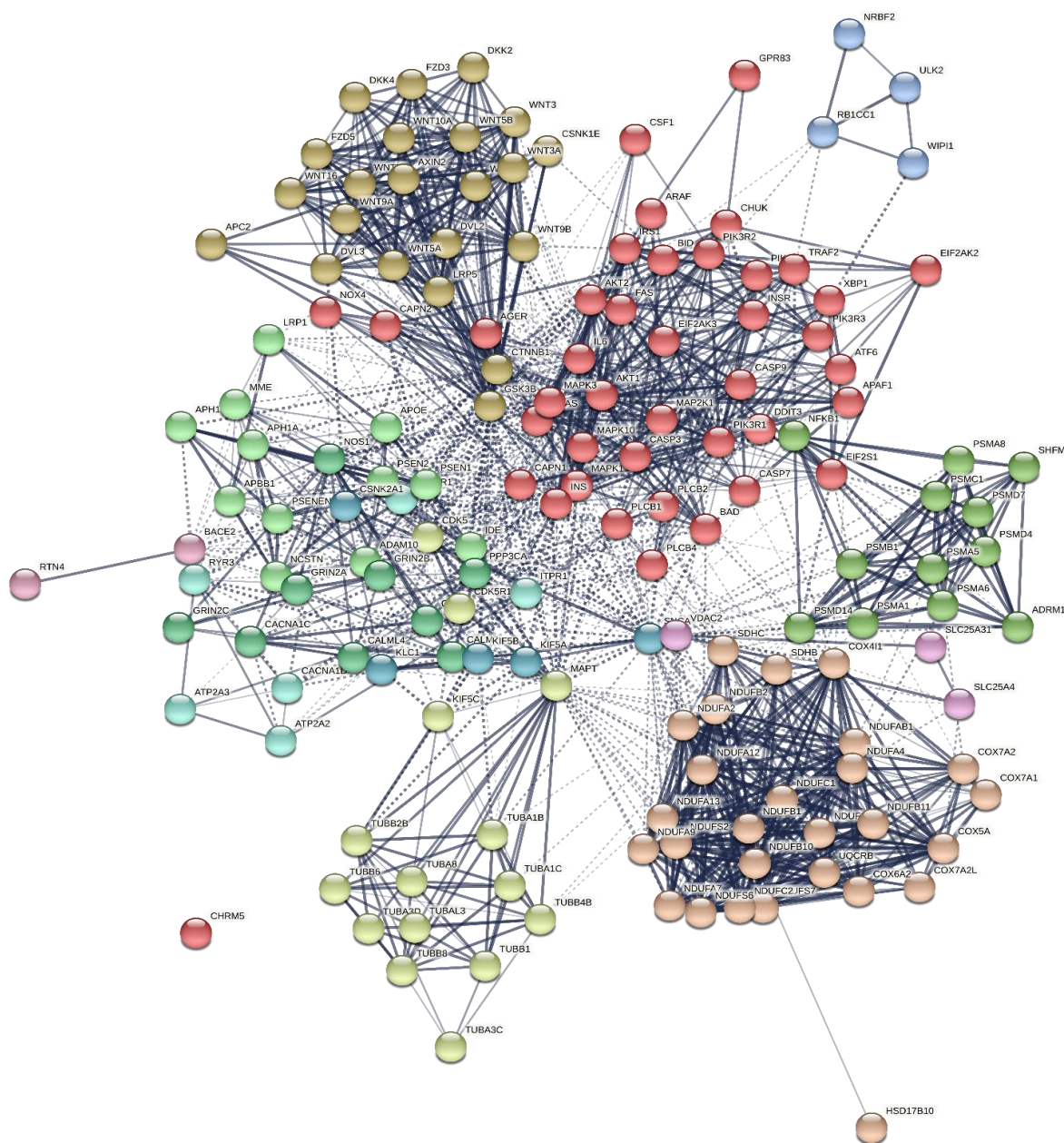


Рисунок 2 – Кластерный анализ функциональной взаимосвязи белков, кодируемых генами, вовлеченными в развитие болезни Альцгеймера. Каждый кластер имеет свой цвет, который соответствует обозначениям на рисунке 2.

Проведение кластерного анализа позволило продемонстрировать вовлеченность БА-ассоциированных генов в широкий спектр биологических процессов, что, в свою очередь, подчеркивает сложность патофизиологии БА.

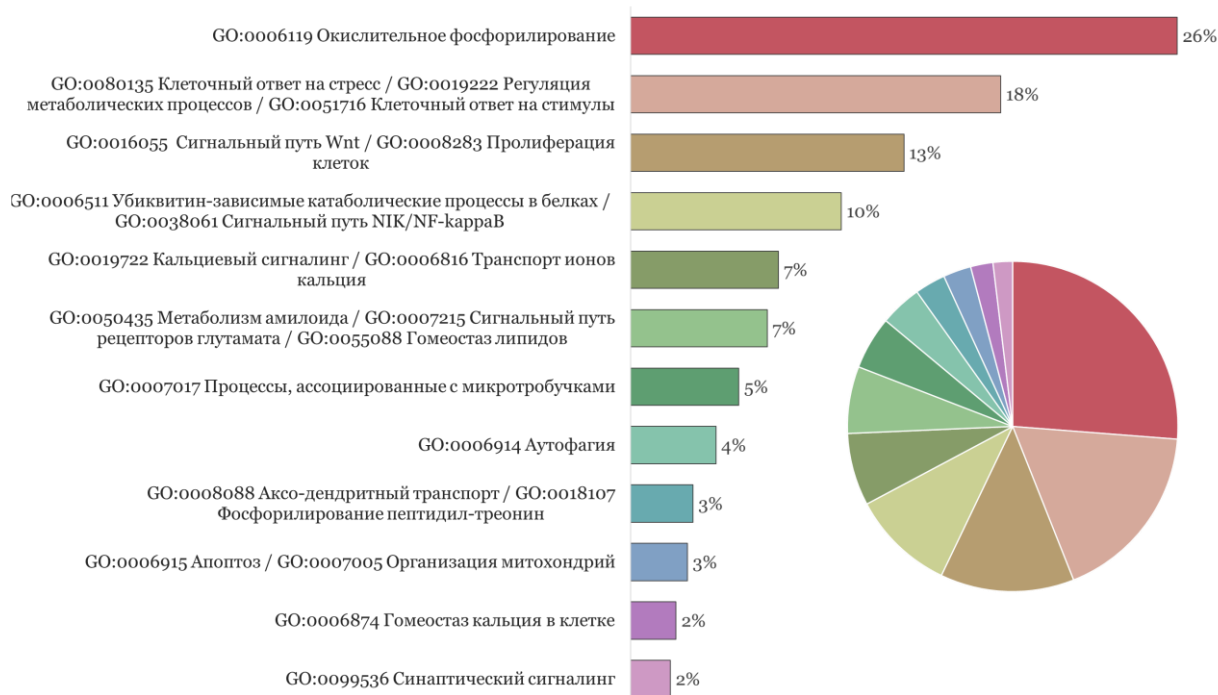


Рисунок 3 – Распределение белков, образующих функциональные кластеры, связанные с развитием патогенеза БА. Диаграмма справа отражает долю каждого функционального кластера в общей сети взаимодействий. Цвет кластера соответствует цвету на рисунке 1.

На следующем этапе было необходимо определить совокупность генов, которые потенциально являются мишенями для связывания пептидов KE, EDR, AEDG (этап 2). Для этого с помощью базы данных EPD, которая на момент написания работы насчитывает 29598 промоторов генов человека, определяли промоторы, в которых имеются нуклеотидные последовательности – сайты связывания пептидов KE, EDR, AEDG с ДНК (указаны в п. 2.1.).

Нуклеотидная последовательность TCGA, по которой связывается пептид KE с двунитевой ДНК *in silico*, была найдена в 1283 промоторах генов человека. Это свидетельствует о том, что пептид KE потенциально связывается с промоторами и регулирует экспрессию 1283 генов человека.

Таким образом, суммарно из 29598 генов человека 1283 генов потенциально являются мишенями связывания пептида KE в промоторной области.

Нуклеотидная последовательность TTGC, по которой связывается пептид EDR с двунитевой ДНК *in silico*, была найдена в 4426 промоторах генов человека. Это свидетельствует о том, что пептид EDR потенциально связывается с промоторами и регулирует экспрессию 4426 генов человека. Таким образом, суммарно из 29598 генов человека 4426 генов потенциально являются мишенями связывания пептида EDR в промоторной области.

Нуклеотидная последовательность TTCCCGGC, по которой связывается пептид AEDG с двунитевой ДНК *in silico*, была найдена в 104 промоторах генов человека. Это свидетельствует о том, что пептид AEDG потенциально связывается с промоторами и регулирует экспрессию 104 генов человека. Таким образом, суммарно из 29598 генов человека 104 генов потенциально являются мишенями связывания пептида AEDG в промоторной области.

Далее проводили сравнительный анализ совокупностей, полученных на этапах 1 и 2, с целью идентификации повторяющихся генов в двух совокупностях. В ходе анализа было выявлено 28, 82, 57 генов (обозначим их как «целевые гены»), которые связаны с развитием БА и в промоторах которых располагаются сайты связывания пептидов KE, EDR, AEDG, соответственно. Таким образом, 8%, 22%, 15% генов, ассоциированных с патогенезом БА, являются потенциальными мишенями пептидов KE, EDR, AEDG, соответственно. Следует отметить, что уникальными (специфичными) мишенями для пептида KE являются 2%, для пептида EDR – 5%, для пептида AEDG – 1% (табл. 2, рис. 4).

Результаты скрининга коротких пептидов и прогнозирования их биологических мишеней, ассоциированных с болезнью Альцгеймера у человека

Пептид	Последовательность ДНК	Количество мишеней в промоторах генов человека (в % от общего числа 29598)	Из них ассоциированы с БА (в % от общего числа 369)	Из них уникальны для пептида (в % от общего числа 369)
KE	TCGA	1283	28 (6%)	6 (2%)
EDR	TTGC	4426	82 (17%)	18 (5%)
AEDG	TTCCCGGC	104	57 (14%)	2 (1%)

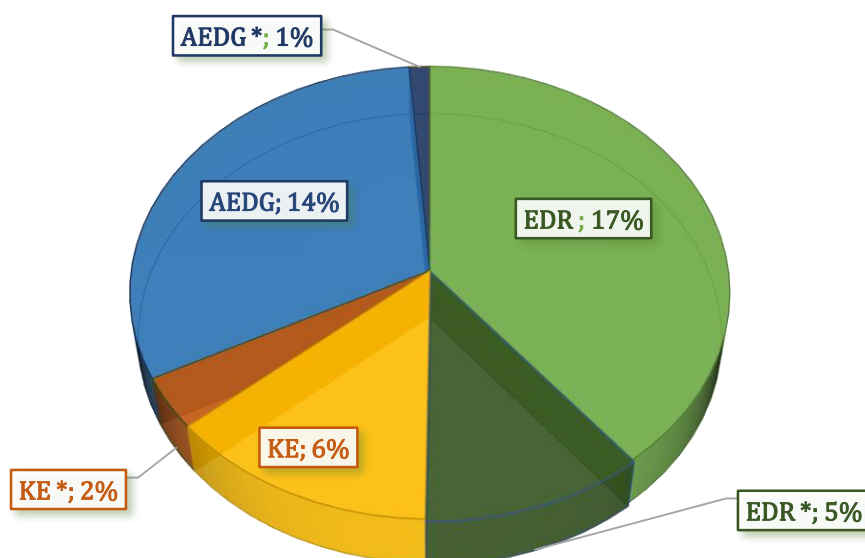


Рисунок 4 – доля БА-ассоциированных генов, в промоторах которых находятся сайты связывания пептидов AEDG, EDR, KE.

\* – доля уникальных мишеней для указанного пептида.

При функциональном анализе белковые продукты 28 целевых генов для пептида KE были разделены на 5 кластеров (рис. 5, 6), характеризующихся следующими терминами: GO:0042981 Регуляция апоптоза / GO:0001932 Регуляция фосфорилирования белков (FADD, WIPI2, MTOR, MAP2K7, RAF1), GO:0042775 Синтез АТФ (SDHA), hsa04979 Метаболизм холестерина,

GO:0050435 Метаболизм амилоида, CL:21050 Функционирование пути Wnt, и белков семейства Frizzled/Smoothened.

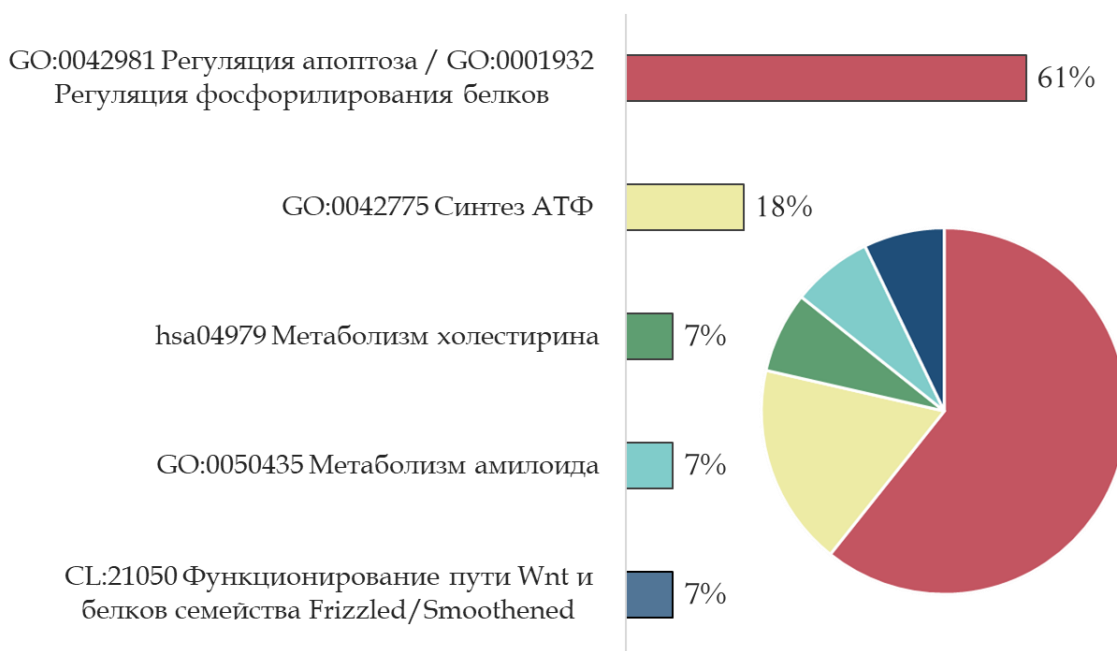


Рисунок 5 – Распределение белковых продуктов генов-мишеней для пептида KE, образующих функциональные кластеры в зависимости от процесса, в который вовлечены. Диаграмма справа отражает долю каждого функционального кластера в общей сети взаимодействий. Цвет кластера соответствует цвету на рисунке 6.

Проведенный анализ позволяет заключить, что потенциальными генетическими мишенями нейропротекторного действия пептида KE при БА у человека являются гены, вовлеченные в процессы апоптоза, фосфорилирования белков, метаболизм холестерина и амилоида, функционирование пути Wnt.

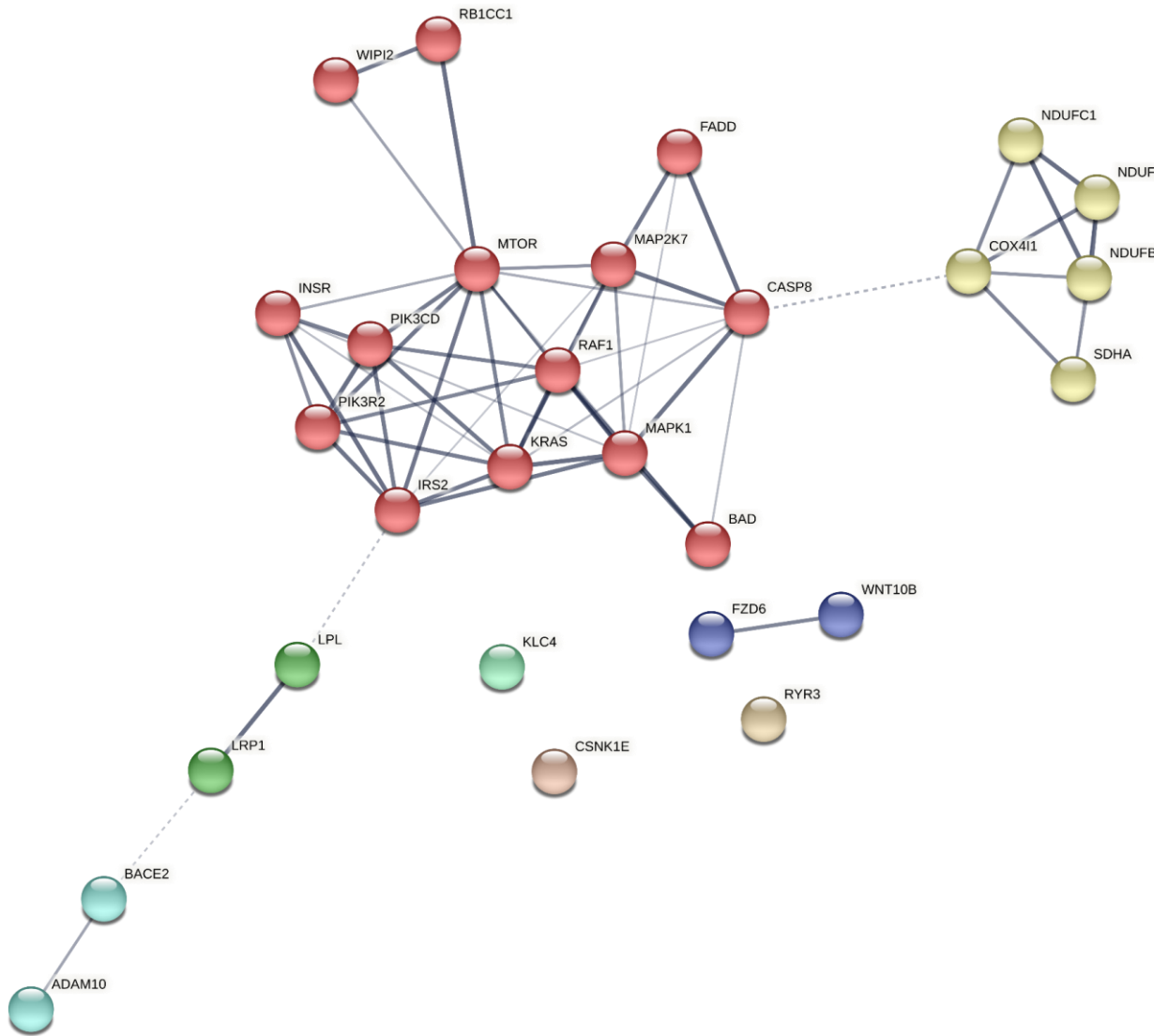


Рисунок 6 – Функциональная взаимосвязь белков, кодируемых генами-мишенями для пептида KE, которые вовлечены в развитие болезни Альцгеймера. Все мишени разбиты на функциональные кластеры (условно обозначены одним цветом). Сплошные линии между белками свидетельствуют о взаимосвязи в рамках одного кластера, прерывные – между кластерами.

При функциональном анализе белковые продукты 82 целевых генов для пептида EDR были разделены на 9 кластеров (рис. 7, 8), характеризующихся следующими терминами GO: 0006119 Окислительное фосфорилирование (NDUFB8, NDUFA8, NDUFS4, NDUFA12, COX4I2,

COX5B), 0042981 Регуляция апоптоза / 0034599 Клеточный ответ на окислительный стресс (TNFRSF1A, VDAC2), 0043687 Пост-трансляционные модификации белков (PSMB5, PSMD8, PSMA3), 0034205 Формирование бета-амилоида / 0006629 Метаболизм липидов (APOE), 0016055 Сигнальный путь Wnt (WNT1, DKK4), 0007017 Процессы, ассоциированные с микротрубочками (TUBA8), 0006914 Аутофагия, 0019722 Кальциевый сигналинг (ITPR3), 0014065 Сигнальный путь PI3K / 0046326 Регуляция транспорта глюкозы (IRS1). В скобках указаны белковые продукты генов, специфичных для пептида EDR.

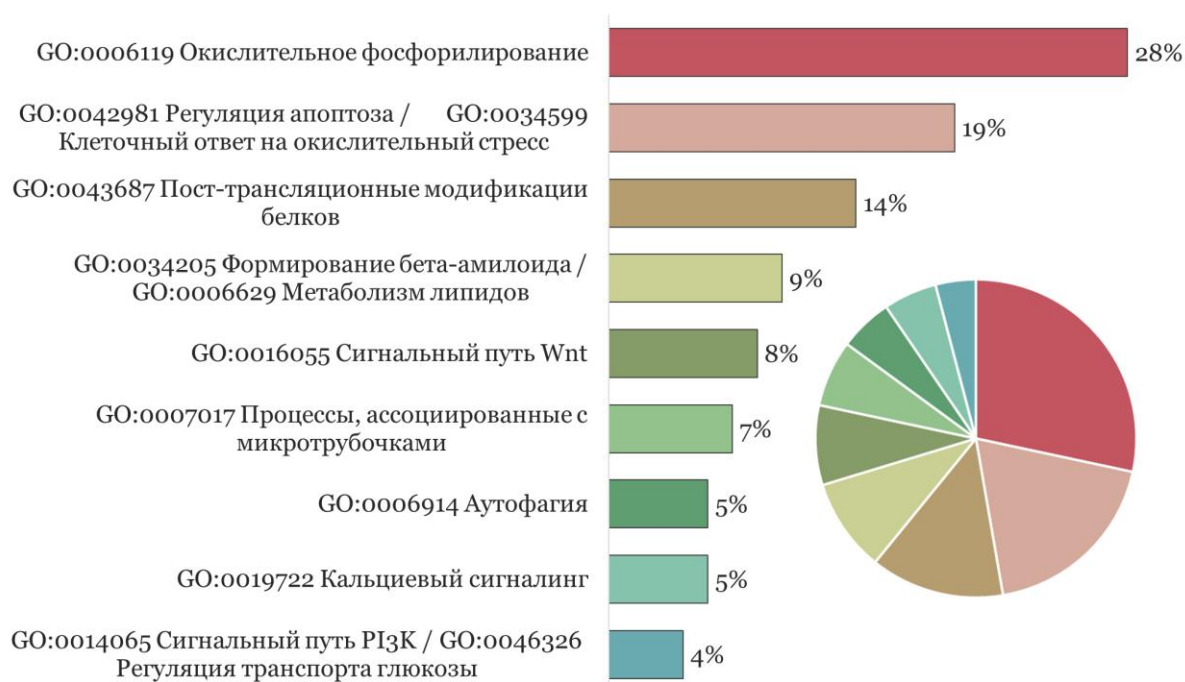


Рисунок 7 – Распределение белковых продуктов генов-мишеней для пептида EDR, образующих функциональные кластеры в зависимости от процесса, в который вовлечены. Диаграмма справа отражает долю каждого функционального кластера в общей сети взаимодействий. Цвет кластера соответствует цвету на рисунке 8.

Проведенный анализ позволяет заключить, что потенциальными генетическими мишенями нейропротекторного действия пептида EDR при БА у человека являются гены, вовлеченные в процессы окислительного

фосфорилирования и посттрансляционных модификаций белков, регуляции окислительного стресса, метаболизме амилоида, функционирования микротрубочек, кальциевый сигналинг, транспорт глюкозы и апоптоз. Несмотря на то, что проведенный анализ имеет прогностический характер, его результаты согласуются с большим объемом работ по исследованию биологических свойств пептида EDR в разных патологических процессах.

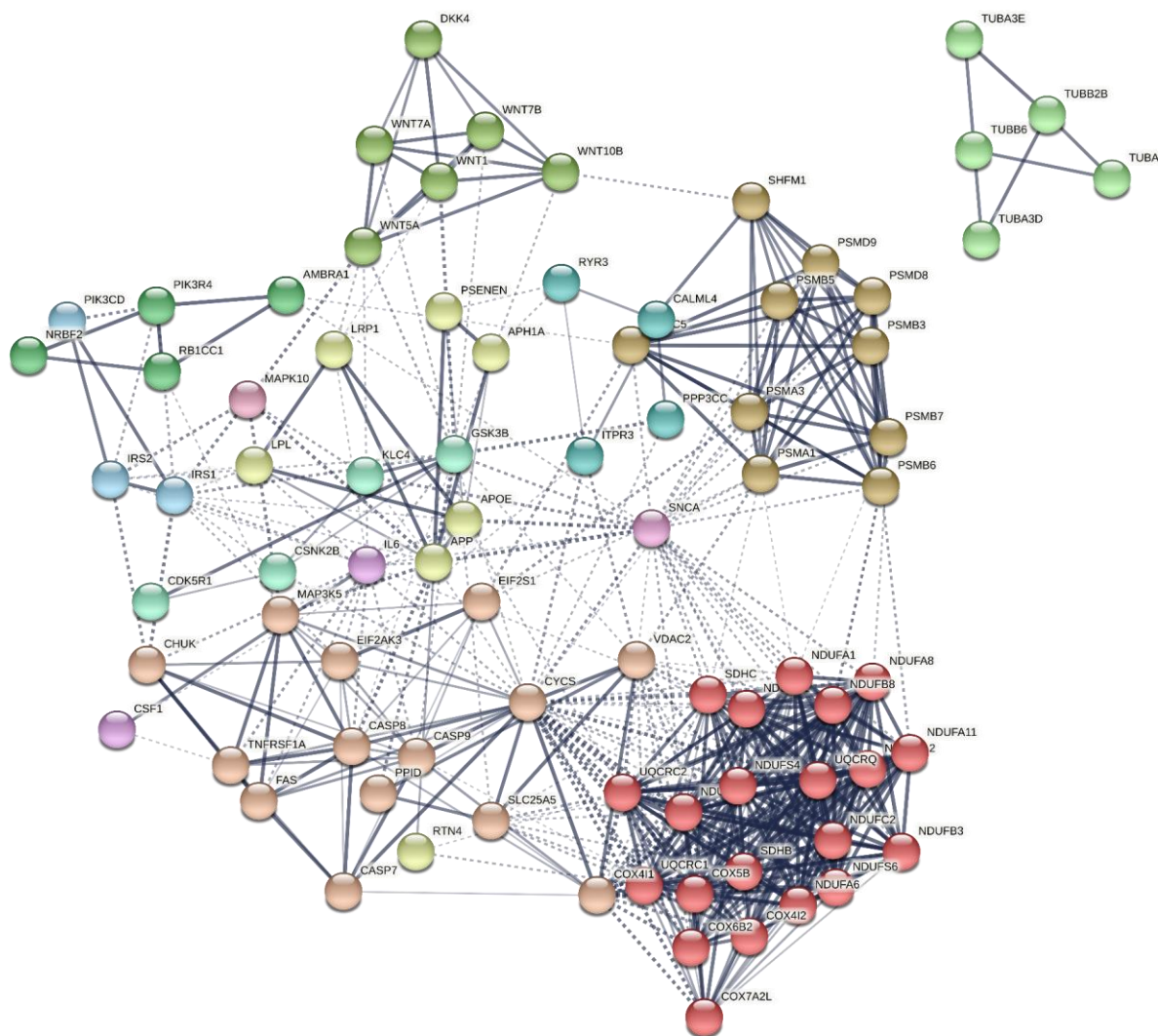


Рисунок 8 – Функциональная взаимосвязь белков, кодируемых генами-мишенями для пептида EDR, которые вовлечены в развитие болезни Альцгеймера. Все мишени разбиты на функциональные кластеры (условно обозначены одним цветом). Сплошные линии между белками свидетельствуют о взаимосвязи в рамках одного кластера, прерывные – между кластерами.

Для пептида AEDG были выявлены специфичные гены *PSMC6* и *ATG101*, кодирующие белки, которые участвуют в АТФ-зависимой деградации убиквитинилированных белков и аутофагии, соответственно.

Основываясь на концепции эпигенетической регуляции экспрессии генов и учитывая результаты первичного скрининга, наиболее перспективным пептидом из четырех изученных (KE, EDR, KED, AEDG), обладающим наибольшим количеством мишеней, вовлеченных в патогенез болезни Альцгеймера, является пептид EDR. В связи с этим активность данного пептида рассматривали далее в эксперименте *in vivo*. Пептид KED использовали в качестве пептида сравнения.

### **3.2. Влияние коротких пептидов на синаптическую пластичность в мозге мышей линии 5xFAD в модели болезни Альцгеймера**

Синаптическую пластичность в мозге мышей линии 5xFAD изучали методом регистрации пВПСП при высокочастотной стимуляции коллатералей Шаффера с целью индукции ДВП.

Расположение электродов, цитоархитектоника слоев CA1 области гиппокампа при стимуляции коллатералей Шаффера показаны на рис. 9.

При регистрации пВПСП до и после индукции были получены кривые полевых ответов, пример которых изображен на рисунке 10.

При введении трипептидов трансгенным мышам не выявлено достоверного изменения относительного угла наклона восходящей фазы пВПСП по сравнению с контролем (Mann–Whitney U test,  $p=0,316$  и  $p=0,057$ , соответственно) (табл. 3, рис. 12, 13).

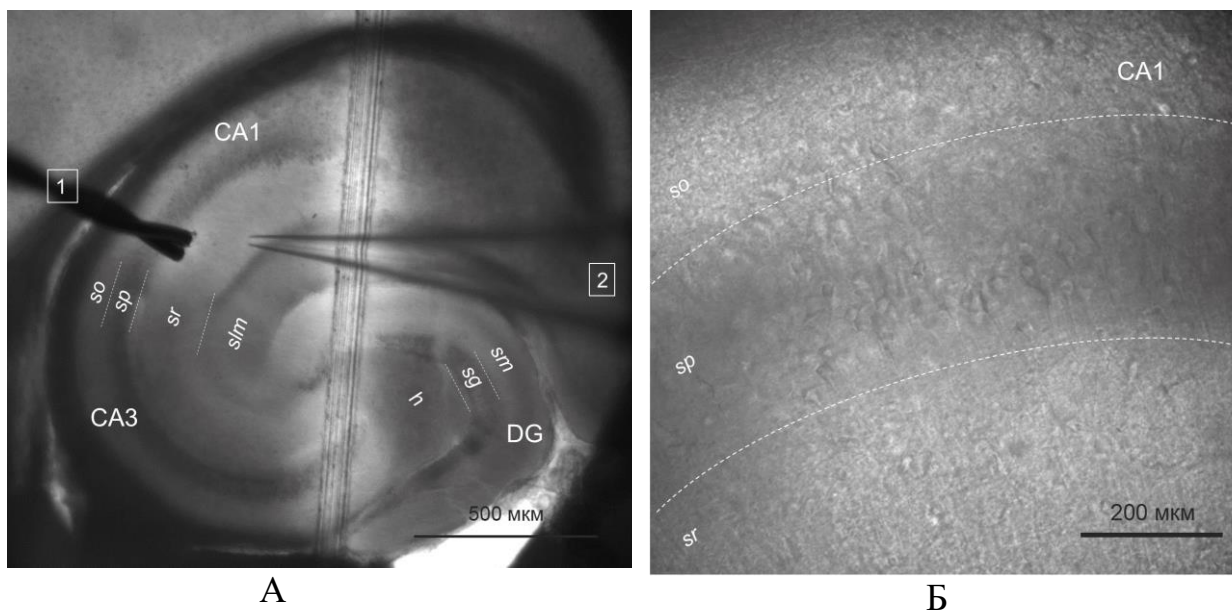


Рисунок 9 – Переживающие срезы гиппокампа мыши линии 5xFAD в возрасте 4 месяцев при электрофизиологическом исследовании. Обозначения клеточных слоев: *so* – *stratum oriens*, *sp* – *stratum pyramidale*, *sr* – *stratum radiatum*, *slm* – *stratum lacunosum-moleculare*, *sl* – *stratum lucidum*, *sm* – *stratum moleculare*, *sg* – *stratum granulosum*. А – расположение стимулирующего (1) и регистрирующего (2) электродов. Световая микроскопия, x40. Б – цитоархитектоника CA1 области гиппокампа. Световая микроскопия, x100.

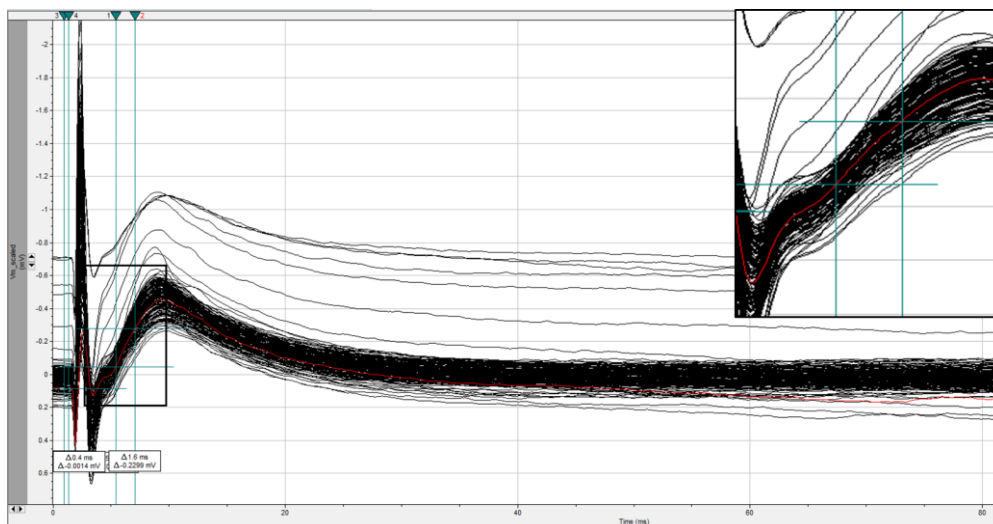


Рисунок 10 – Пример полевого ответа (потенциала), зарегистрированного в *stratum radiatum* CA1 области гиппокампа мыши в течение 60 мин после стимуляции коллатералей Шаффера. Слева – визуализация полевого ответа в программе Clampex программного пакета pClamp 10.7 (Molecular devices, USA), справа – увеличенное изображение восходящей волны полевого ответа с выделенной линейной областью для количественного анализа.

Таблица 3

Относительный угол наклона пВПСП (slope) в гиппокампе мышей дикого типа и линии 5xFAD в возрасте 4 месяцев

Параметр	WT + ФР	5xFAD+ФР	5xFAD+EDR	5xFAD+KED
Slope, %	19,80±5,82	2,11±6,46	18,08±12,31	27,19±11,23

Примечание: WT – дикий тип, ФР – физиологический раствор

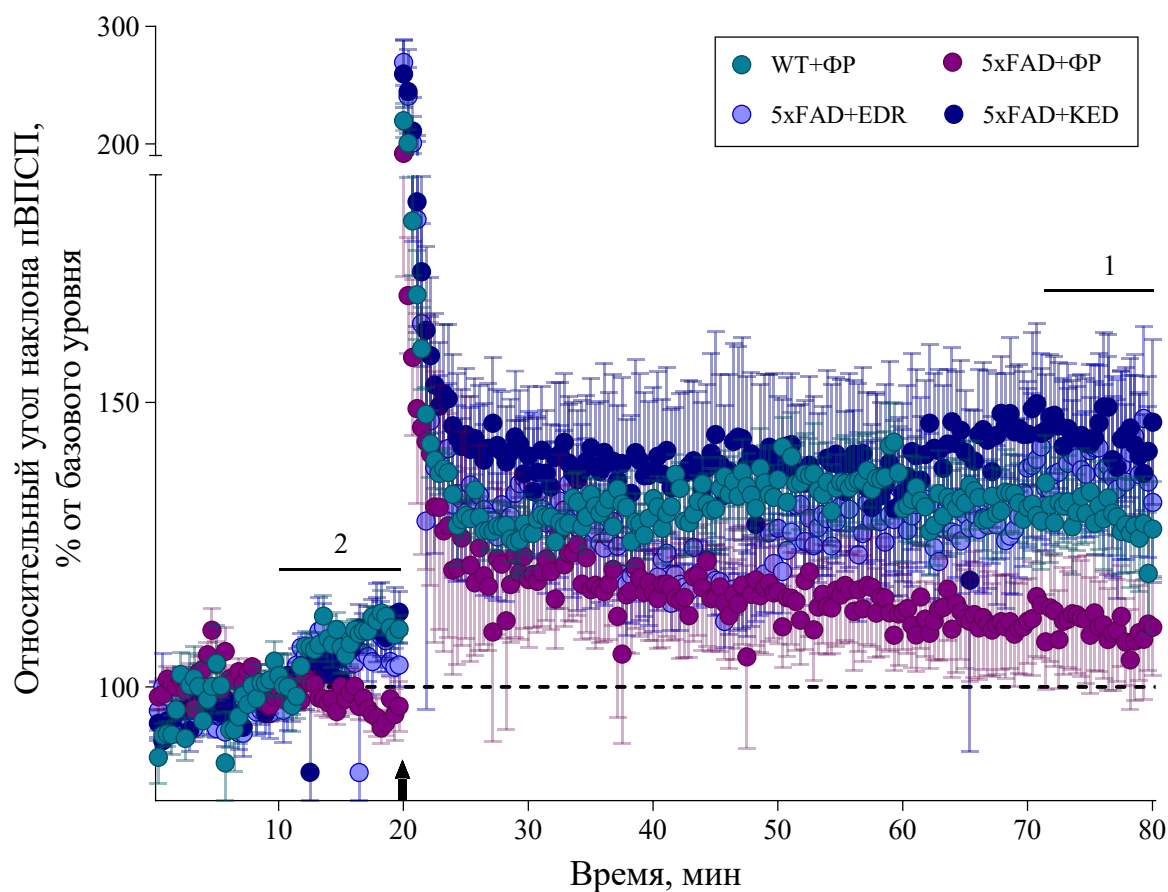


Рисунок 12 – Количественная оценка пВПСП, регистрируемого в *stratum radiatum* CA1 области гиппокампа мышей до и после индукции ДВП (момент высокочастотной стимуляции коллатералей Шаффера обозначен красной стрелочкой). Каждой точке на графике соответствует среднее значение угла наклона восходящей фазы полевого ответа в пределах группы в каждый момент времени. Линии 1 и 2 обозначают интервалы времени, в которых количественно оценивали величину потенциации.

При анализе результатов с помощью S-критерия тенденций Джонкира (рис. 13) была выявлена выраженная тенденция возрастания относительного угла наклона восходящей фазы пВПСП при изменении показателя от контроля (5xFAD) к группам EDR, WT и KED ( $p < 0,05$ ).

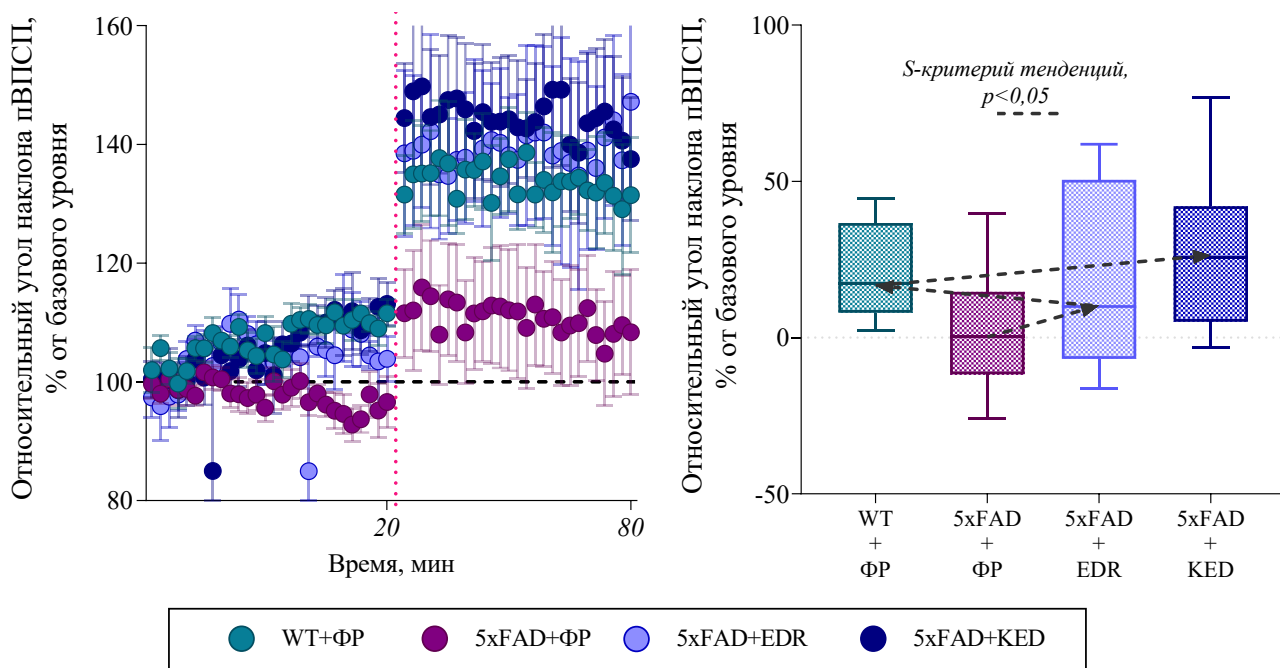


Рисунок 13 – Количественная оценка синаптической пластичности. Слева – Значения относительного угла наклона восходящей фазы вПСП в течение 10 мин до и после индукции ДВП. Справа – диаграмма размаха («box plot») показателя пластичности по группам. Стрелками указано направление изменения показателя в соответствии с S-критерием тенденций Джонкира.

Полученный результат указывает на наличие тенденции к снижению синаптической пластичности у мышей линии 5xFAD, что согласуется с литературными данными [Crouzin N. et al., 2013; Popugaeva E. et al., 2019; Wang M. et al., 2019].

Выраженная тенденция к увеличению ДВП у мышей линии 5xFAD под действием пептида KED свидетельствует о потенциальной способности данного пептида восстанавливать синаптическую пластичность на ранней стадии БА.

### **3.3. Характеристика модели прогрессирующей синаптической дегенерации 5xFAD-M при болезни Альцгеймера**

В лаборатории молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого была получена линия мышей 5xFAD-M для изучения морфологических изменений в дендритных шипиках нейронов.

#### **3.3.1. Получение трансгенной линии 5xFAD-M**

Трансгенная линия 5xFAD-M была получена путем кросс-бридинга мышей линии 5xFAD с мышами линии M. Скрещивание производили по схеме на рисунке 14, результаты генотипирования продемонстрированы на рисунке 15.

На первом этапе скрещивание мышей линии Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J и дикого типа (P1) привело к появлению потомства F1 на бэкграунде C57/B6XSJL, среди которых были особи, несущие трансген GFP (M), и мыши дикого типа. На втором этапе из этого потомства животных линии M скрещивали с мышами линии 5xFAD (P2), в результате чего в потомстве F2 были получены мыши, имеющие в геноме три трансгена APP, PSEN1, GFP, и мыши с одним трансгеном GFP. Это потомство животных использовали для разведения (P3) мышей линии 5xFAD-M и формирования экспериментальных групп для оценки морфологии дендритных шипиков при БА *in vivo*.

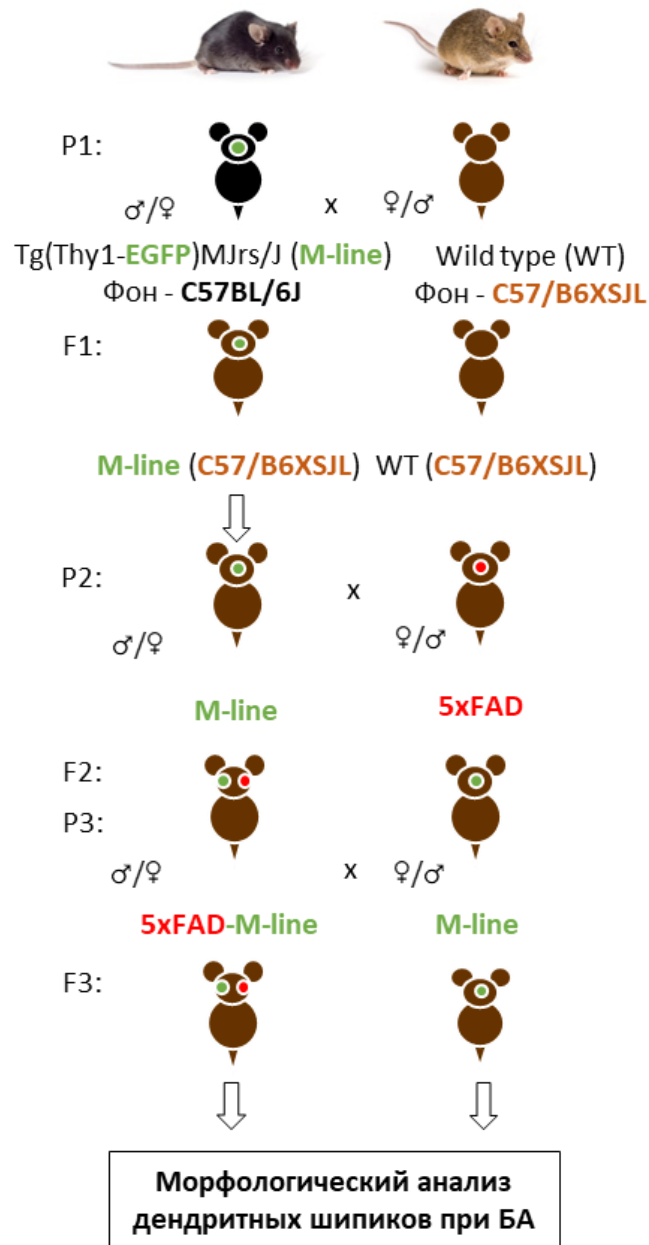


Рисунок 14 – Схема выведения трансгенной линии мышей 5xFAD-M. Черный и коричневый цвета мыши условно обозначают генетический фон (бэкграунд) C57BL/6J и C57/B6XSJL, соответственно, на котором исходно произведена трансгенная линия. P – родители, F – потомство. Описание в тексте.

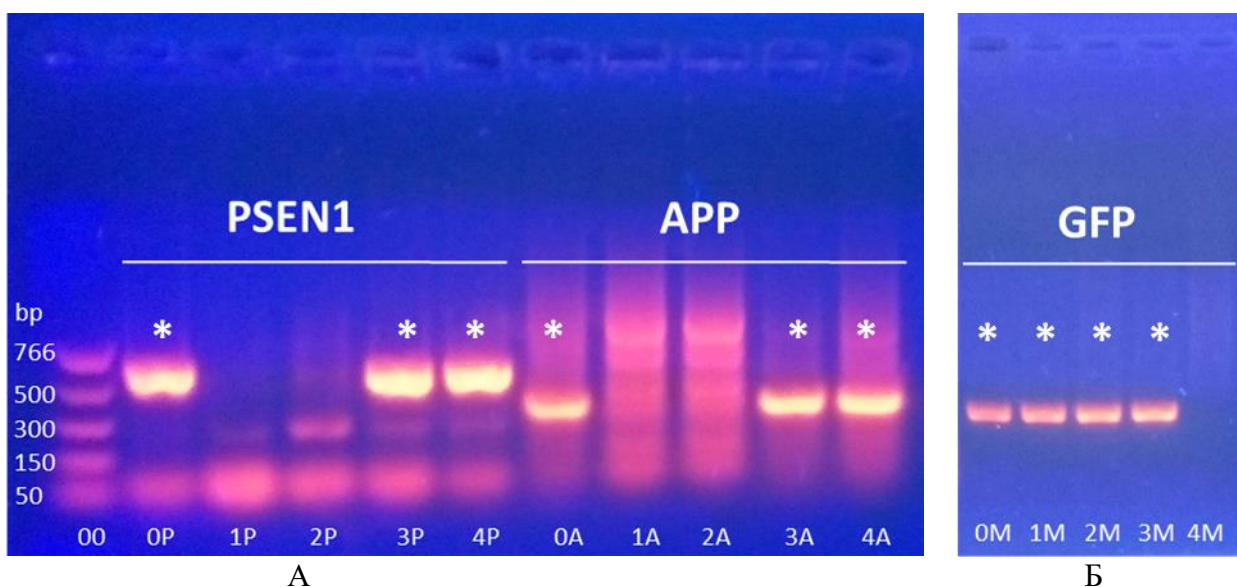


Рисунок 15 – Демонстрация результатов генотипирования четырех мышей (№ 1, 2, 3, 4) на предмет выявления в их геноме трансгенов APP, PSEN1, GFP. На рисунках изображены фрагменты агарозного геля (синий фон) после ДНК-электрофореза продуктов ПЦР-реакции (на трансгены PSEN1, APP, GFP). Яркое свечение бэндов (\*) соответствует реакции интеркалирующего красителя GelRed с продуктами амплифицированной ДНК и свидетельствует о наличии трансгена. Изображения получены с помощью персональной видеокамеры при просмотре агарозного геля в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Обозначения: 00 – маркер молекулярного веса (base pair, bp), 0 – положительный контроль для соответствующего трансгена.

### 3.3.2. Оценка экспрессии зеленого флуоресцентного белка в мозге мышей линии 5xFAD-M

На фиксированных срезах мозга мышей линии 5xFAD-M и дикого типа был проведен анализ распределения GFP в нейронах CA1 области гиппокампа (рис. 16).

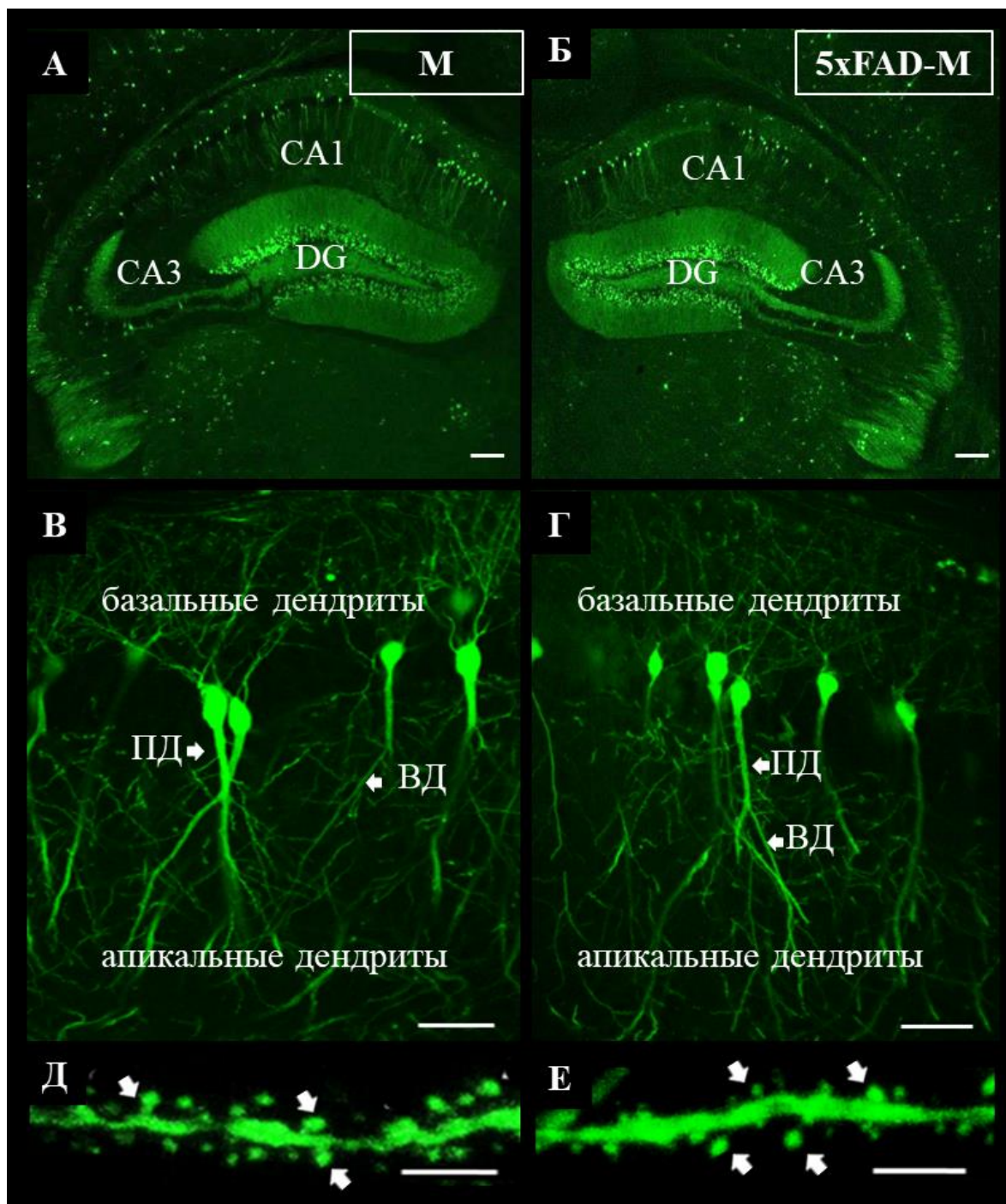


Рисунок 16 – Экспрессия зеленого флуоресцентного белка (GFP) в нейронах головного мозга мышей линии М (контроль) и 5xFAD-М. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. А, Б – CA1 и CA3 области гиппокампа, зубчатая извилина (DG); В, Г – базальные и апикальные дендриты пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа; Д, Е – шипики вторичных апикальных дендритов пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа. Линия масштаба – 200 мкм (А, Б), 50 мкм (В, Г), 10 мкм (Д, Е).

Интегративная плотность пикселей, соответствующих экспрессии GFP в соме [83,78±2,17 а.у.; Two-tailed Welch's t-test, p=0,6802] и дендритных шипиках [75,47±1,62 а.у.; Two-tailed Welch's t-test, p=0,4752] пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа мышей линии 5xFAD-M статистически значимо не отличалась от данного показателя в контрольной группе мышей линии M [84,97±1,72 а.у., 77,66±2,56 а.у. в соме и шипиках соответственно] (рис. 17). Интегративная плотность пикселей, соответствующих экспрессии GFP в дендритах [80,32±0,77 а.у.; Two-tailed Welch's t-test, p=0,0456] пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа мышей линии 5xFAD-M оказалась на 5% достоверно ниже данного показателя в контрольной группе мышей линии M [84,63±1,80 а.у.], что вероятно может быть обусловлено истощением дендритного дерева на ранних этапах развития БА.

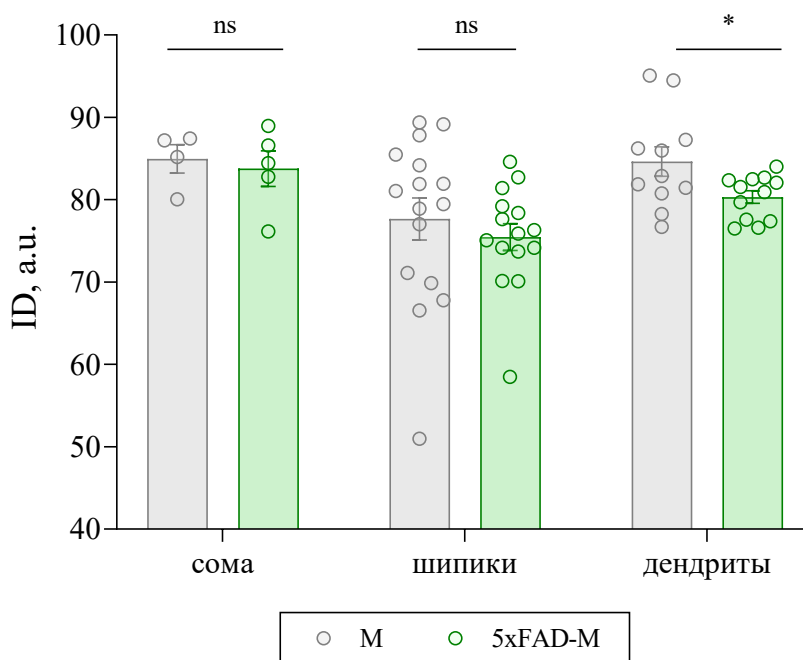


Рисунок 17 – Интегративная плотность пикселей, соответствующих экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) в соме, дендритах и шипиках нейронов CA1 области гиппокампа мышей линии M (контроль) и 5xFAD-M. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). \* – p<0,05 по сравнению с контролем (линия M).

Отсутствие достоверных различий в интегративной плотности пикселей, соответствующих экспрессии GFP в дендритных шипиках пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа, позволяет корректно провести дальнейший морфологический анализ.

### **3.3.3. Патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M разного возраста**

Изучение возрастных особенностей морфологических изменений синаптических структур гиппокампа при БА позволяет выявлять патогенетические особенности развития БА на ранних стадиях, а также выявлять терапевтическое окно для тестирования потенциальных соединений.

Патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M оценивали в возрасте 4-х и 5-ти месяцев ввиду литературных данных о развитии патологии у мышей линии 5xFAD. В частности, когнитивные нарушения у животных данной линии в тесте «водный лабиринт Морриса» наблюдаются в возрасте 6 месяцев. Учитывая тот факт, что клеточные изменения, а именно - нарушение синаптической пластичности, лежит в основе когнитивной дисфункции, возраст для оценки морфологических изменений дендритных шипиков был выбран более ранний (4, 5 месяцев).

Результаты анализа возрастных патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M в модели БА представлены в таблице 4 и рисунках 18 – 20. У мышей линии 5xFAD-M в возрасте 4 месяцев плотность дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа достоверно не отличается от контроля 1 [Two-way ANOVA:  $F(1,66) = 10.31$ ,  $p=0,002$ ; Tukey's test:  $q=2.865$ ,  $DF=66$ ,  $p=0,189$ ]. Относительное количество грибовидных, тонких и пеньковых шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M достоверно не отличалось от соответствующих показателей у мышей контрольной линии M [MS: Mann-Whitney U test:  $U(67,69) = 31$ ,  $p=0.959$ , TS: Mann-Whitney U test:

U (72.50, 3.50) = 27.5, p=0.665, SS: Mann–Whitney U test: U (65, 71) = 29, p=0.798].

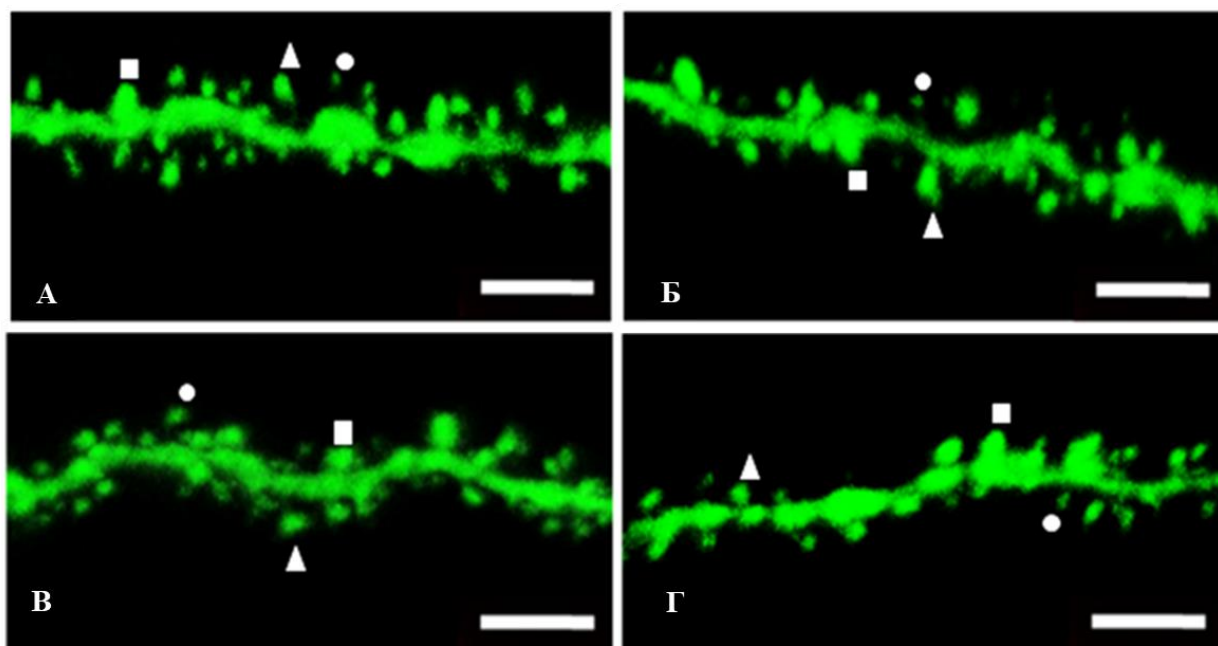


Рисунок 18 – Вторичные апикальные дендриты нейронов CA1 области гиппокампа в мозге мышей. Слева – линия М, справа – 5xFAD-М, сверху – в возрасте 4 месяцев, снизу – в возрасте 5 месяцев. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Зеленый цвет соответствует экспрессии зеленого флуоресцентного белка. x1000. Обозначения: круг – тонкий шипик, треугольник – грибовидный шипик, квадрат – пеньковый шипик.

Таблица 4

Морфологические параметры дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линий М и 5xFAD-М в возрасте 4 и 5 месяцев

Возраст	Параметр	Линия М (контроль)	Линия 5xFAD-М
4 месяца	DSD, шипиков/10 мкм	13,82±0,62	11,63±0,74
	MS, %	34,83±2,02	36,44±2,48
	TS, %	47,68±2,48	43,29±3,51
	SS, %	17,86±1,88	20,26±2,35
5 месяцев	DSD, шипиков/10 мкм	12,52±0,38	10,62±0,49**
	MS, %	45,06±1,64	30,22±2,77**
	TS, %	39,07±1,78	48,21±4,20*
	SS, %	15,61±1,02	16,15±1,45

Примечание: данные указаны в формате среднее±ошибка среднего. \*, \*\* – p<0.05, p<0.01 по сравнению с мышами контрольной группы.

Доля дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита у мышей 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев была достоверно снижена на 15% по сравнению с контролем 1 [Two-way ANOVA:  $F(1,66) = 10.31, p=0,002$ ; Tukey's test:  $q=2.865, DF=66, p=0,022$ ]. Было выявлено достоверное снижение относительного количества дендритных шипиков грибовидного типа у мышей линии 5xFAD-M на 21% по сравнению с контролем 1 [Mann-Whitney U test:  $U(1056, 429) = 198, p=0.008$ ]. Относительное количество дендритных шипиков тонкого типа у мышей линии 5xFAD-M на 19% достоверно превышало этот показатель у мышей контрольной группы 1 [Mann-Whitney U test:  $U(794, 691) = 233, p=0.044$ ]. Статистически значимых различий в относительном количестве дендритных шипиков пенькового типа у мышей линии М и 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев выявлено не было [Mann-Whitney U test:  $U(860, 625) = 299, p=0.405$ ].

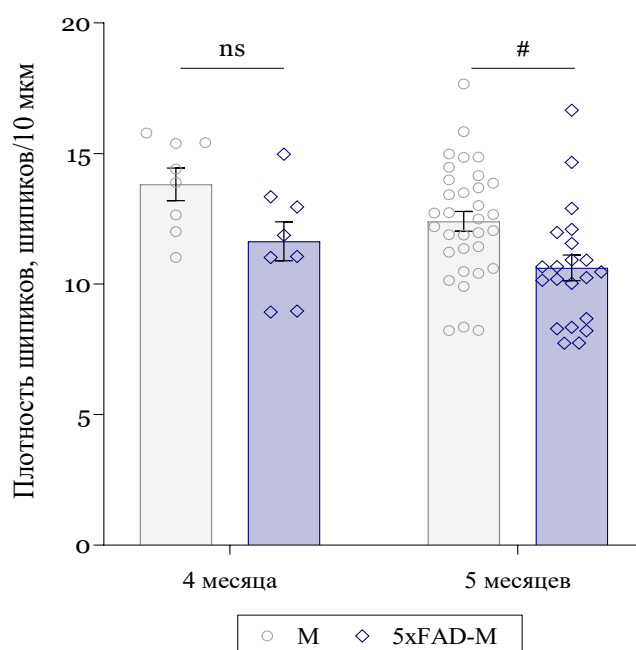


Рисунок 19 – Количество дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита на нейронах CA1 гиппокампа у мышей разного возраста. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг, ромб), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). # –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ns – статистически не значимо.

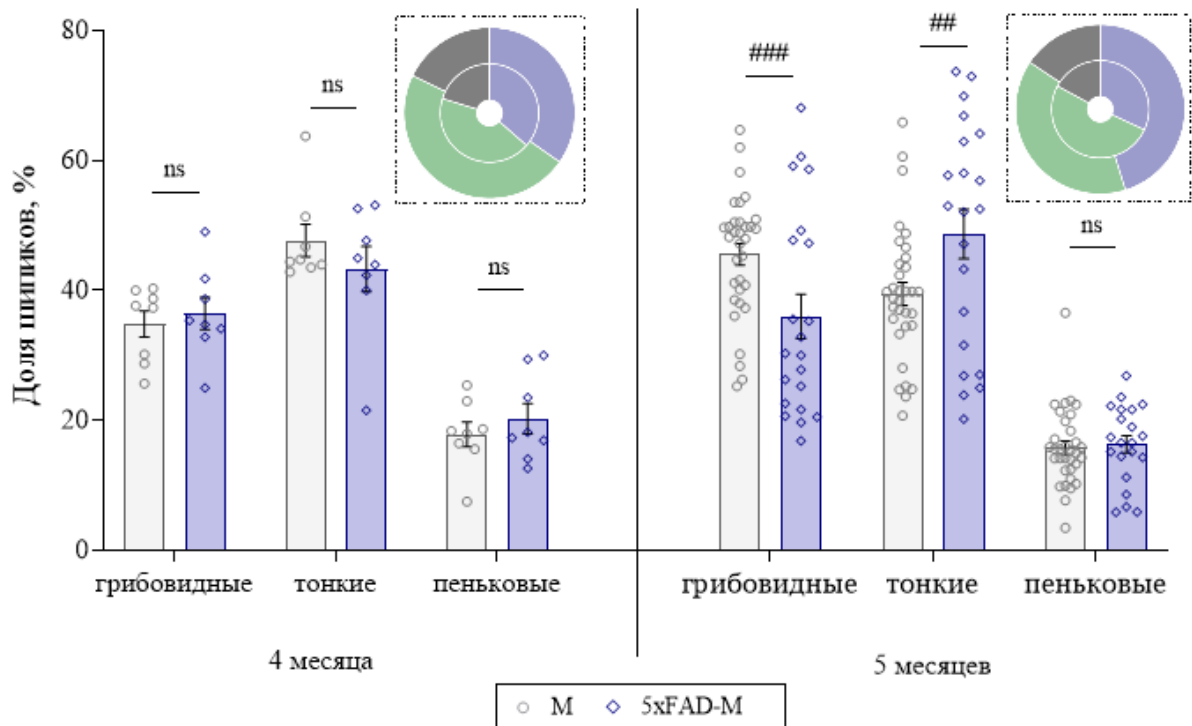


Рисунок 20 – Доля дендритных шипиков каждого типа у мышей разного возраста. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг, ромб), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). Круговые диаграммы отражают долю каждого типа шипиков от общего количества у мышей линии М (снаружи) и 5xFAD-M (внутри) в соответствии с цветом: зеленый – тонкий тип, синий – грибовидный тип, черный – пеньковый тип. ##, ### –  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  по сравнению с контролем соответствующего возраста; ns – статистически не значимо.

Таким образом, у мышей линии 5xFAD-M в возрасте с 4 до 5 месяцев наблюдается элиминация дендритных шипиков грибовидного типа, которые являются наиболее функционально активными. Полученные результаты согласуются с литературными данными о развитии синаптической дисфункции при БА и фенотипических особенностях мышей линии 5xFAD.

### **3.3.4. Патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов СА1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M разного пола**

В литературе имеются сведения о половых различиях в течении БА у мужчин и женщин. Женщины подвержены большему риску развития деменции при БА, тогда как мужчины подвергаются большему риску развития сосудистой деменции [Podcasy, Epperson, 2016]. Что касается линии мышей 5xFAD, то данные неоднозначны. Так, у молодых самок линии 5xFAD в возрасте с 2-х до 5-ти мес амилоидная патология выражена сильнее, чем у самцов [Oakley et al., 2006]. Кроме того, изменения экспрессии медиаторов воспаления и глиальных маркеров более выражены у самок линии 5xFAD, начиная с трехмесячного возраста, тогда как у самцов не наблюдалось четкой тенденции до 5 мес [Manji, 2019]. В связи с этим, оценивали развитие патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов отдельно у самцов и самок. Результаты представлены в таблице 5 и на рисунках 21 – 23.

Доля дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита в СА1 области гиппокампа у самцов мышей линии 5xFAD-M была снижена на 15% по сравнению с данным показателем в контроле 1 [Mann–Whitney U test:  $U(1082, 403) = 172, p=0.002$ ]. Относительное количество дендритных шипиков грибовидного типа у мышей-самцов линии 5xFAD-M достоверно снижалось на 21% по сравнению с этим показателем у мышей контрольной группы 1 [Mann–Whitney U test:  $U(1056, 429) = 198, p=0.008$ ]. Относительное количество дендритных шипиков тонкого типа у мышей-самцов линии 5xFAD-M на 19% достоверно превышало этот показатель у мышей контрольной группы 1 [Mann–Whitney U test:  $U(794, 691) = 233, p=0.044$ ]. Статистически значимых различий в относительном количестве дендритных шипиков пенькового типа у мышей линии М и 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев выявлено не было [Mann–Whitney U test:  $U(860, 625) = 299, p=0.405$ ].

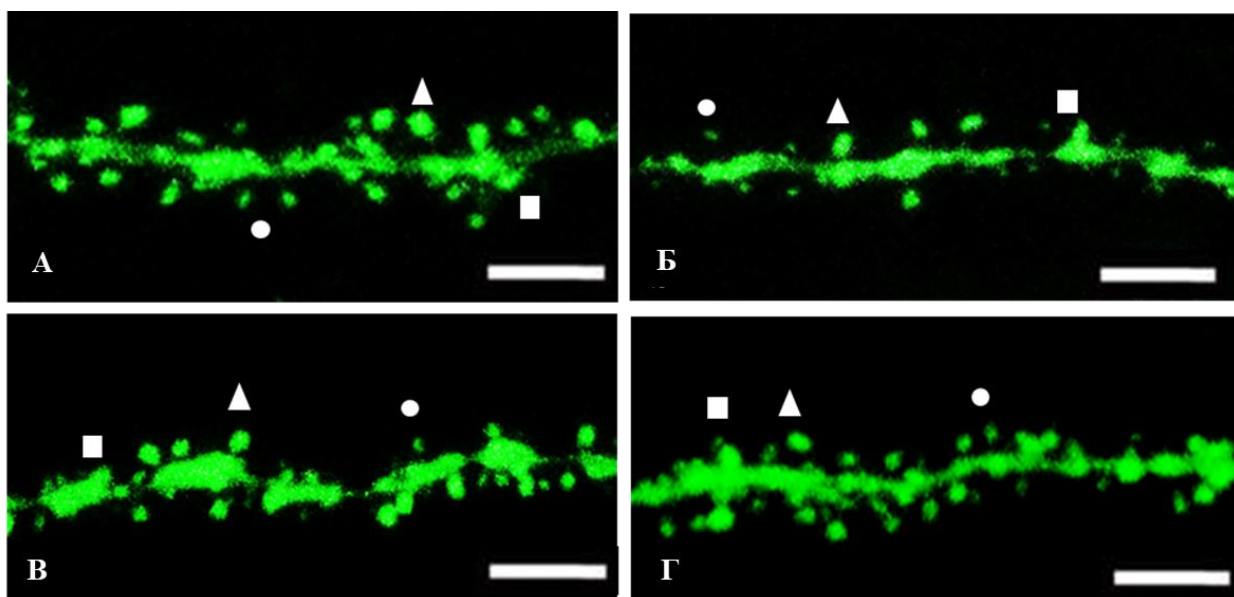


Рисунок 21 – Вторичные апикальные дендриты нейронов CA1 области гиппокампа в мозге самцов (А, Б) и самок (В, Г) мышей линий М (контроль, слева) и 5xFAD-М (справа). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Зеленый цвет соответствует экспрессии зеленого флуоресцентного белка. x1000. Обозначения: круг – тонкий шипик, треугольник – грибовидный шипик, квадрат – пеньковый шипик.

Таблица 5

Морфологические параметры дендритных шипиков нейронов гиппокампа мышей линий М и 5xFAD-М разного пола в возрасте 5 месяцев

Пол	Параметр	Линия М (контроль)	Линия 5xFAD-М
самцы	DSD, шипиков/10 мкм	12,52±0,38	10,62±0,49**
	MS, %	45,06±1,64	30,22±2,78**
	TS, %	39,07±1,78	48,21±4,20*
	SS, %	15,61±1,02	16,15±1,45
самки	DSD, шипиков/10 мкм	13,39±0,53	11,74±0,49*
	MS, %	43,94±1,44	35,60±1,62***
	TS, %	42,65±1,69	51,38±1,76***
	SS, %	13,31±0,98	12,63±1,05

Примечание: данные указаны в формате среднее±ошибка среднего. \*, \*\*, \*\*\* –  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  по сравнению с мышами контрольной группы.

Доля шипиков на 10 мкм длины дендрита на нейронах СА1 области гиппокампа у самок мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев была снижена на 12% по сравнению с контролем 1 [Mann–Whitney U test:  $U(894, 817) = 256, p=0.014$ ]. На 19% было снижено относительное количество дендритных шипиков грибовидного типа у самок 5xFAD-M по сравнению с контролем 1 [Mann–Whitney U test:  $U(950, 761) = 200, p=0.0006$ ]. Относительное количество дендритных шипиков тонкого типа у мышей-самок линии 5xFAD-M на 17% достоверно превышало этот показатель у мышей контрольной группы 1 [Mann–Whitney U test:  $U(536.5, 1175) = 211.5, p=0.001$ ]. Статистически значимых различий в относительном количестве дендритных шипиков пенькового типа у мышей линии М и 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев выявлено не было [Mann–Whitney U test:  $U(778, 933) = 372, p=0.530$ ].

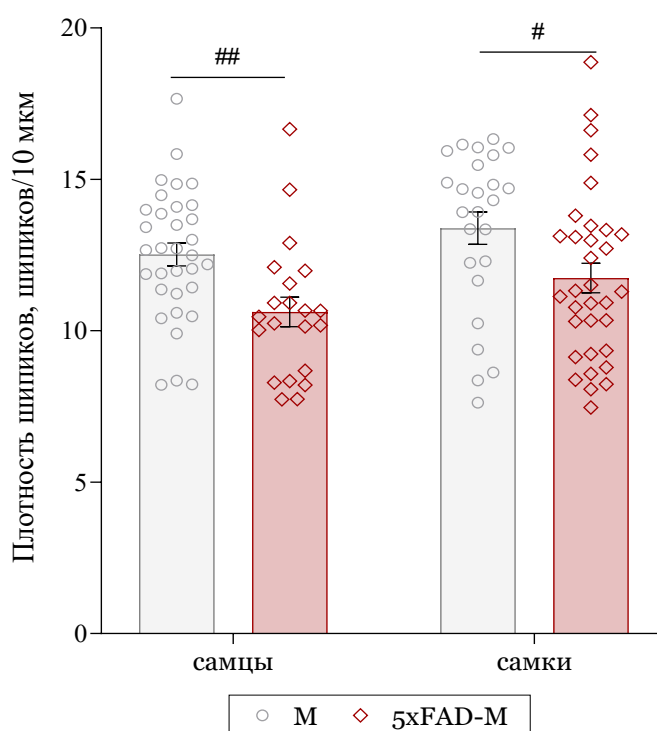


Рисунок 22 – Изменения плотности дендритных шипиков нейронов СА1 области гиппокампа у мышей разного пола. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг, ромб), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). #, ## –  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  по сравнению с контролем соответствующего возраста;

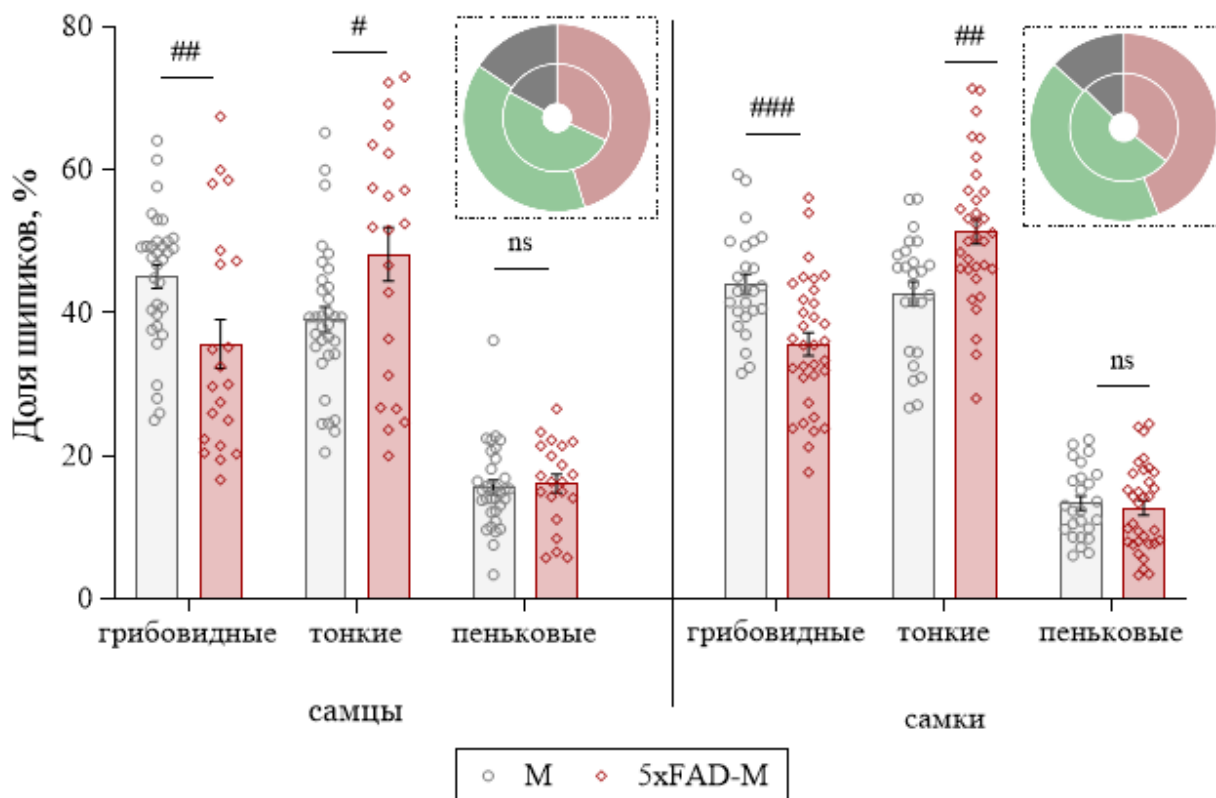


Рисунок 23 – Доля дендритных шипиков каждого типа у мышей разного пола. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг, ромб), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). Круговые диаграммы отражают долю каждого типа шипиков от общего количества у мышей линии M (снаружи) и 5xFAD-M (внутри) в соответствии с цветом: зеленый – тонкий тип, синий – грибовидный тип, черный – пеньковый тип. \*, \*\*, \*\*\* –  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  по сравнению с контролем соответствующего пола; ns – статистически не значимо.

### 3.4. Влияние коротких пептидов на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M в модели болезни Альцгеймера

Влияние коротких пептидов на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа при БА изучали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на фиксированных срезах мозга мышей линий M (контроль) и 5xFAD-M, которым вводили короткие

пептиды и физиологический раствор. Результаты представлены в таблице 6 и на рисунках 24-25.

У мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес, которых подвергали курсовому введению пептида EDR выявлено увеличение доли дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита на нейронах в СА1 области гиппокампа на 11% по сравнению с контролем 2 [ $p=0.039$ ]. Относительное количество дендритных шипиков грибовидного типа у мышей линии 5xFAD-M, которым вводили пептид EDR, достоверно не отличалось от этого показателя у мышей линии 5xFAD-M с введением физиологического раствора [ $p=0.053$ ]. Относительное количество дендритных шипиков тонкого типа у мышей линии 5xFAD-M, которым вводили пептид EDR, достоверно снижалось на 10% по сравнению с контролем [ $p=0.024$ ]. Достоверных изменений в количестве пеньковых шипиков выявлено не было [ $p=0.162$ ].

Таблица 6

Морфологические параметры дендритных шипиков нейронов гиппокампа мышей линий M и 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев под воздействием коротких пептидов и физиологического раствора

Параметр	M +ФР (контроль)	5xFAD-M+ФР	5xFAD-M+EDR	5xFAD-M+KED
DSD, шипиков/10 мкм	12.52±0.38	10.62±0.49**	12.64 ± 0.31*	12.48 ± 0.28
MS, %	45.06±1.64	30.22±2.77**	39.15 ± 1.08	41.25 ± 1.09*
TS, %	39.07±1.78	48.21±4.20*	50.15 ± 1.81*	43.84 ± 1.83**
SS, %	15.61±1.02	16.15±1.45	15.90 ± 0.77	14.97 ± 0.85

*Примечание:* данные указаны в формате среднее±ошибка среднего. \*, \*\* –  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$  по сравнению с мышами контрольной группы.

У мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес, которым вводили пептид KED в курсовом режиме в течение 2-х месяцев до исследования, плотность дендритных шипиков нейронов СА1 области гиппокампа достоверно не отличалась от контроля 2 [ $p=0.103$ ]. Относительное количество дендритных шипиков грибовидного типа у мышей линии 5xFAD-M, которым вводили

пептид KED, статистически значимо увеличивалось по сравнению с этим показателем в контроле 2 [ $p=0.003$ ] и достигало этого показателя у мышей контроля 1 [ $p=0.157$ ]. Выявлено достоверное сокращение относительного количества дендритных шипиков тонкого типа на 13% у мышей линии 5xFAD-M при курсовом введении трипептида KED по сравнению с контролем [ $p=0.008$ ]. Достоверных изменений в количестве пеньковых шипиков выявлено не было [ $p = 0.162$ ].

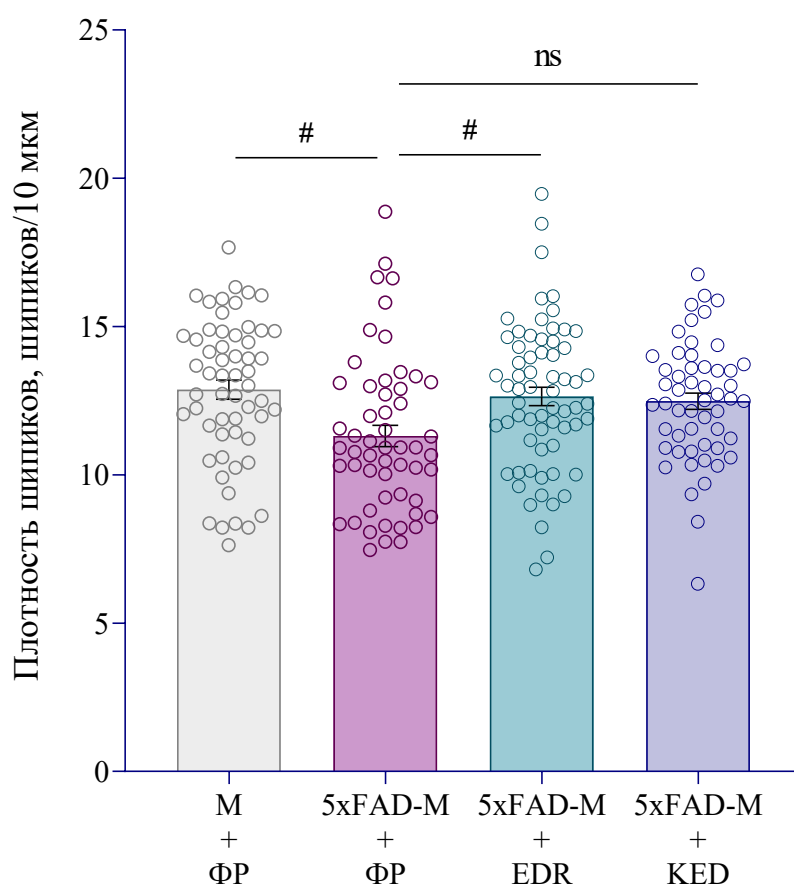


Рисунок 24 – Изменения плотности дендритных шипиков нейронов в СА1 области гиппокампа у мышей под влиянием коротких пептидов и физиологического раствора. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы).

# –  $p < 0,05$  по сравнению с мышами линии 5xFAD-M, которым вводили физиологический раствор; ns – статистически не значимо.

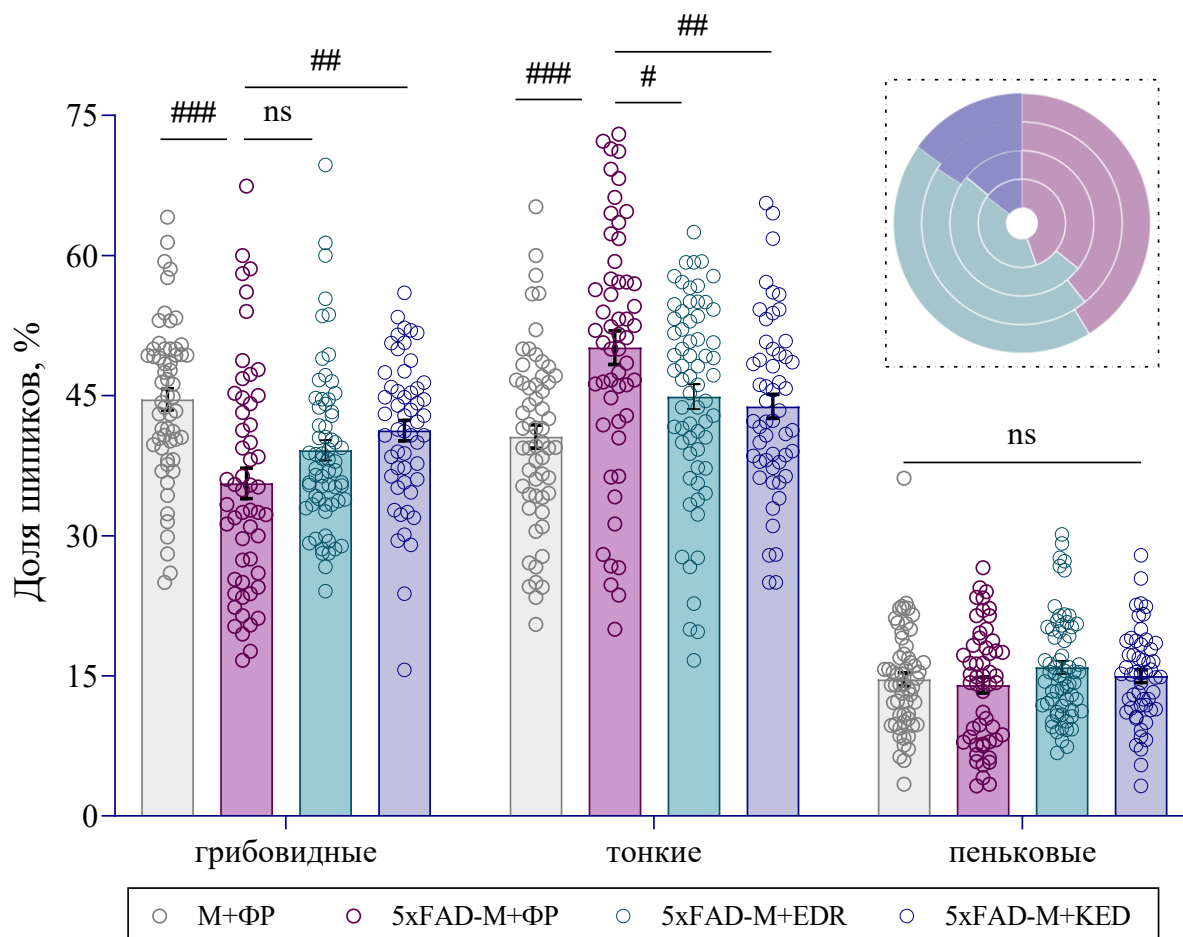


Рисунок 25 – Соотношение основных типов дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей под влиянием коротких пептидов и физиологического раствора. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). Круговые диаграммы отражают долю каждого типа шипиков от общего количества: от центра к периферии данные соответствуют группам на графике слева направо. Цвет на диаграмме соответствует типу шипика: зеленый – тонкий тип, синий – грибовидный тип, черный – пеньковый тип.

#, ##, ### –  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  по сравнению с мышами линии 5xFAD-M, которым вводили физиологический раствор; ns – статистически не значимо.

Таким образом, пептид KED восстанавливал количество наиболее функционально активных дендритных шипиков нейронов в гиппокампе мышей линии 5xFAD-M до уровня нормы, не влияя на общую плотность шипиков. Пептид EDR, напротив, способствовал увеличению общей плотности шипиков, но не влиял на количество наиболее функциональных шипиков грибовидного типа. Ввиду выявленных гендер-ассоциированных различий в развитии патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов гиппокампа при БА нами было принято решение изучить влияние коротких пептидов на данный показатель отдельно у самок и самцов.

### 3.4.1. Влияние пептидов EDR и KED на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у самцов мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев

Результаты представлены в таблице 7 и на рисунках 26 – 28. У мышей-самцов линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес, которым вводили трипептид EDR в курсовом режиме, наблюдалось достоверное увеличение плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа на 13% по сравнению с контролем [ $p = 0.019$ ].

Таблица 7

Морфологические параметры дендритных шипиков нейронов гиппокампа у самцов мышей линий M и 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев под воздействием коротких пептидов и физиологического раствора

Параметр	M + ФР (контроль)	5xFAD-M+ФР	5xFAD-M+EDR	5xFAD-M+KED
<b>DSD, шипиков/10 мкм</b>	12.52±0.38	10.62±0.49**	12.21 ± 0.40*	13.56 ± 0.27***
<b>MS, %</b>	45.06±1.64	30.22±2.78**	40.23 ± 1.52*	41.13 ± 1.48*
<b>TS, %</b>	39.07±1.78	48.21±4.20*	42.01 ± 1.96	43.61 ± 1.46
<b>SS, %</b>	15.61±1.02	16.15±1.45	15.93 ± 1.07	14.16 ± 0.85

*Примечание:* данные указаны в формате среднее±ошибка среднего. \*, \*\*, \*\*\* –  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  по сравнению с мышами контрольной группы.

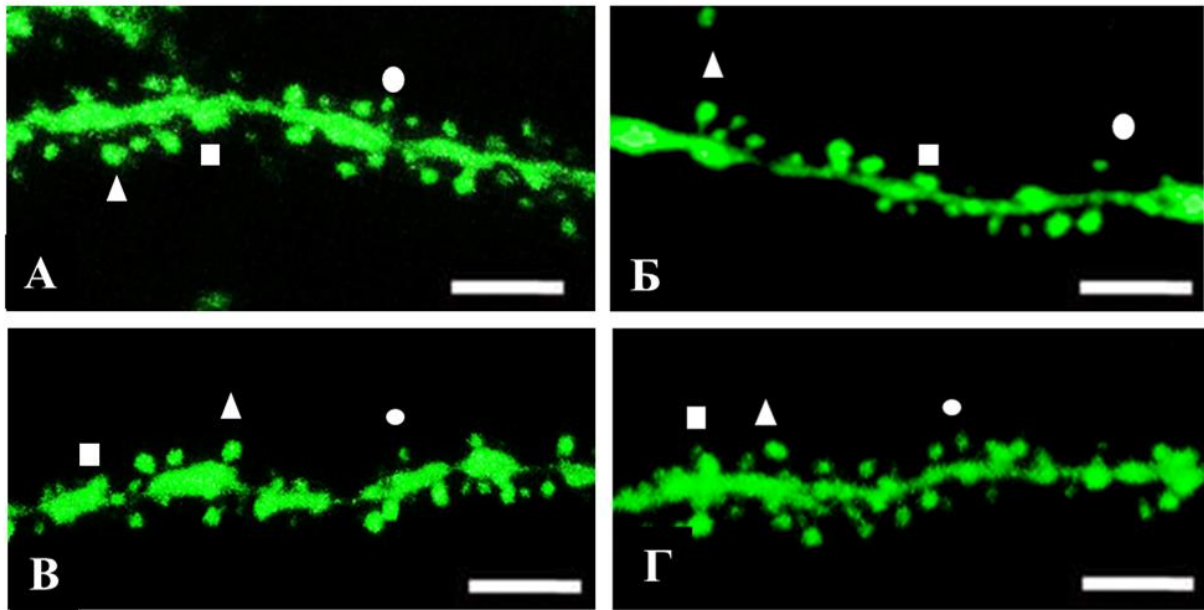


Рисунок 26 – Вторичные апикальные дендриты в СА1 области гиппокампа самцов мышей линий М (контроль, А) и 5xFAD-М в возрасте 5 месяцев, которым вводили пептиды EDR (В), KED (Г) и физиологический раствор (Б). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Зеленый цвет соответствует экспрессии зеленого флуоресцентного белка. x1000. Обозначения: круг – тонкий шипик, треугольник – грибовидный шипик, квадрат – пеньковый шипик.

Наблюдалось увеличение относительного количества дендритных шипиков грибовидного типа у мышей линии 5xFAD-М, которым вводили пептид EDR, на 25% по сравнению с контролем [ $p = 0.004$ ]. Статистически значимых различий в относительном количестве дендритных шипиков тонкого и пенькового типов у мышей линии 5xFAD-М, которым вводили пептид EDR и физиологический раствор, выявлено не было [TS:  $p = 0.123$ ; SS:  $p = 0.998$ ].

У мышей-самцов линии 5xFAD-М в возрасте 5 мес, которым вводили трипептид KED в курсовом режиме, наблюдалось достоверное увеличение плотности дендритных шипиков нейронов СА1 области гиппокампа на 22% [ $p$

= 0.00001], относительного количества грибовидных шипиков – на 27% по сравнению с соответствующими показателями в контроле 2 [ $p = 0.030$ ]. Достоверных изменений в относительном количестве тонких и пеньковых типов шипиков не выявлено [TS:  $p = 0.348$ ; SS:  $p = 0.448$ ].

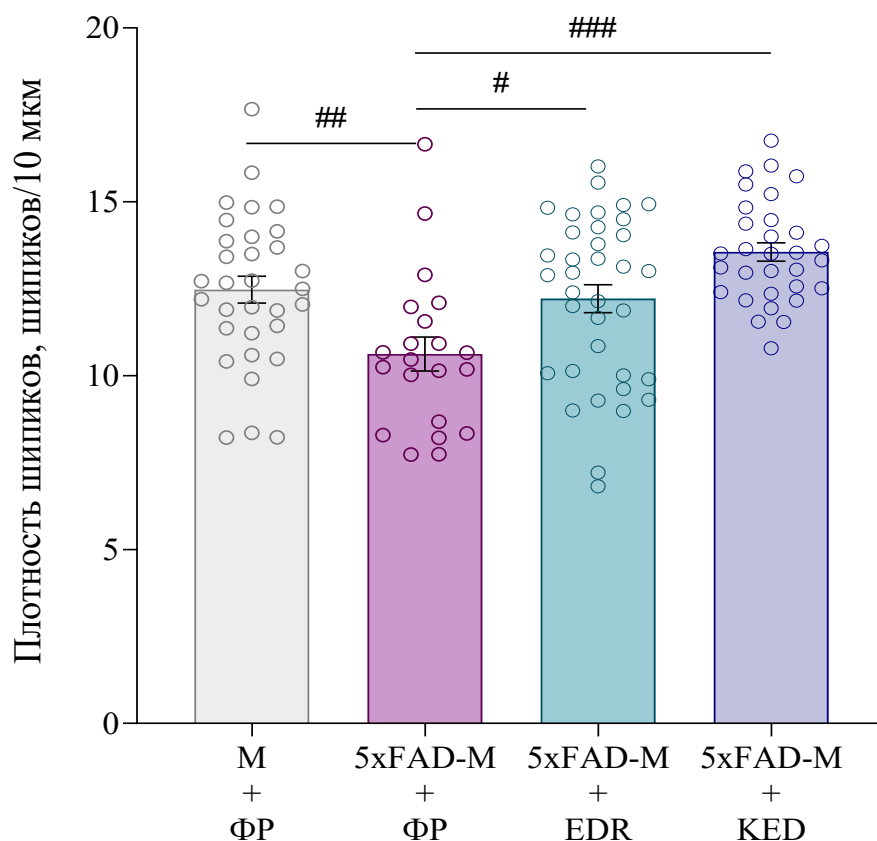


Рисунок 27 – Доля дендритных шипиков на 10 мкм длины дендритов нейронов CA1 области гиппокампа у мышей под воздействием коротких пептидов и физиологического раствора. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы).

#, ##, ### –  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  по сравнению с мышами линии 5xFAD-M, которым вводили физиологический раствор; ns – статистически не значимо.

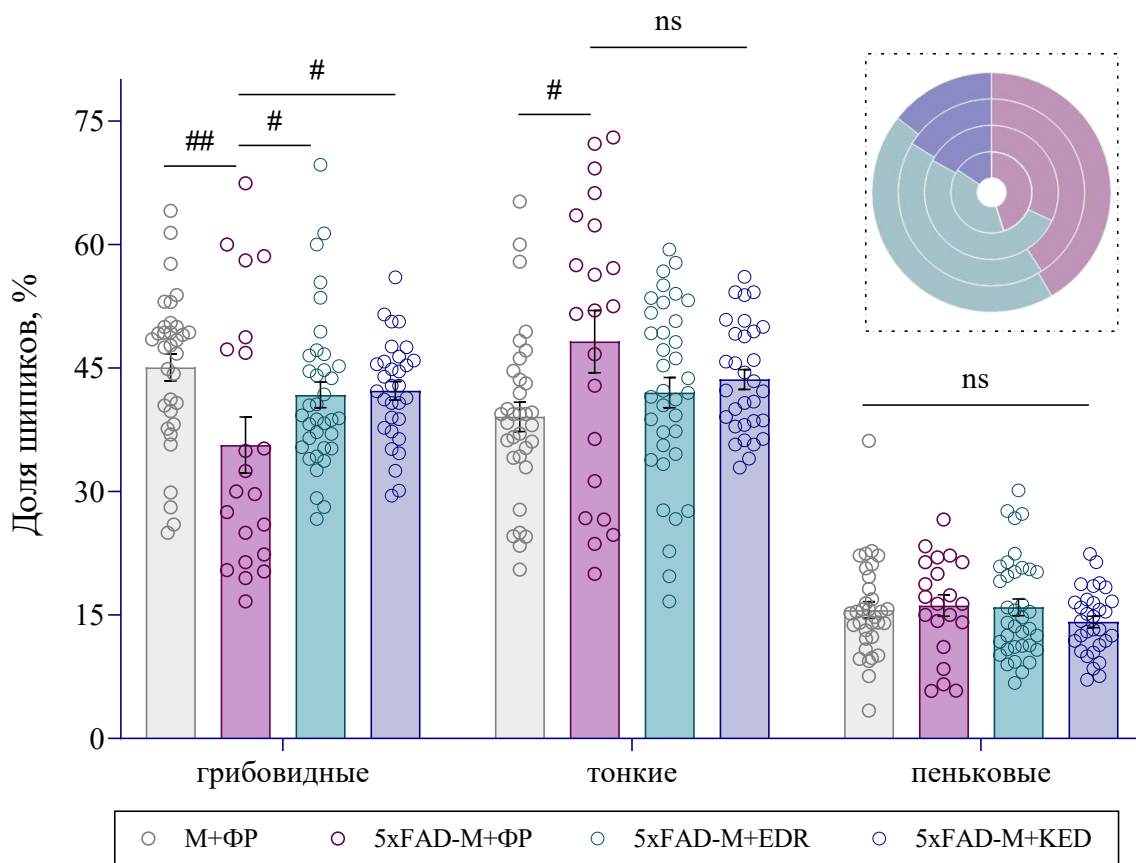


Рисунок 28 – Доля дендритных шипиков каждого типа на нейронах CA1 области гиппокампа у мышей-самцов. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). Круговые диаграммы отражают долю каждого типа шипиков от общего количества: от центра к периферии данные соответствуют группам на графике слева направо. Цвет на круговой диаграмме соответствует типу шипика: зеленый – тонкий тип, лиловый – грибовидный тип, синий – пеньковый тип.

#, ##, ### –  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  по сравнению с контролем; ns – статистически не значимо.

Таким образом, у мышей-самцов линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес выявлено снижение плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа за счет элиминации грибовидных шипиков памяти. Систематическое введение пептидов EDR и KED способствовало

восстановлению количества грибовидных шипиков до уровня нормы, что, в свою очередь, отражалось на нормализации плотности дендритных шипиков у мышей-самцов линии 5xFAD-M.

### **3.4.2. Влияние пептидов EDR и KED на патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов гиппокампа у самок мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев**

Результаты представлены в таблице 8 и на рисунках 29 – 31. У самок мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес, которым вводили трипептид EDR в курсовом режиме, наблюдалось достоверное увеличение плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа на 12% по сравнению с контролем [ $p = 0.035$ ]. Достоверных изменений в относительном количестве грибовидных, тонких и пеньковых дендритных шипиков выявлено не было по сравнению с контролем [MS:  $p = 0.681$ ; TS:  $p = 0.517$ ; SS:  $p = 0.061$ ].

У самок мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес, которых подвергали курсовому введению пептида KED в течение 2-х месяцев до исследования, было выявлено статистически значимое снижение тонких шипиков на 14% по сравнению с контролем 2 [ $p = 0.028$ ]. Плотность шипиков [ $p=0,973$ ], количество грибовидных [ $p=0,109$ ] и пеньковых [ $p=0,062$ ] шипиков нейронов CA1 области гиппокампа достоверно не изменялось у мышей-самок линии 5xFAD-M при введении пептида KED.

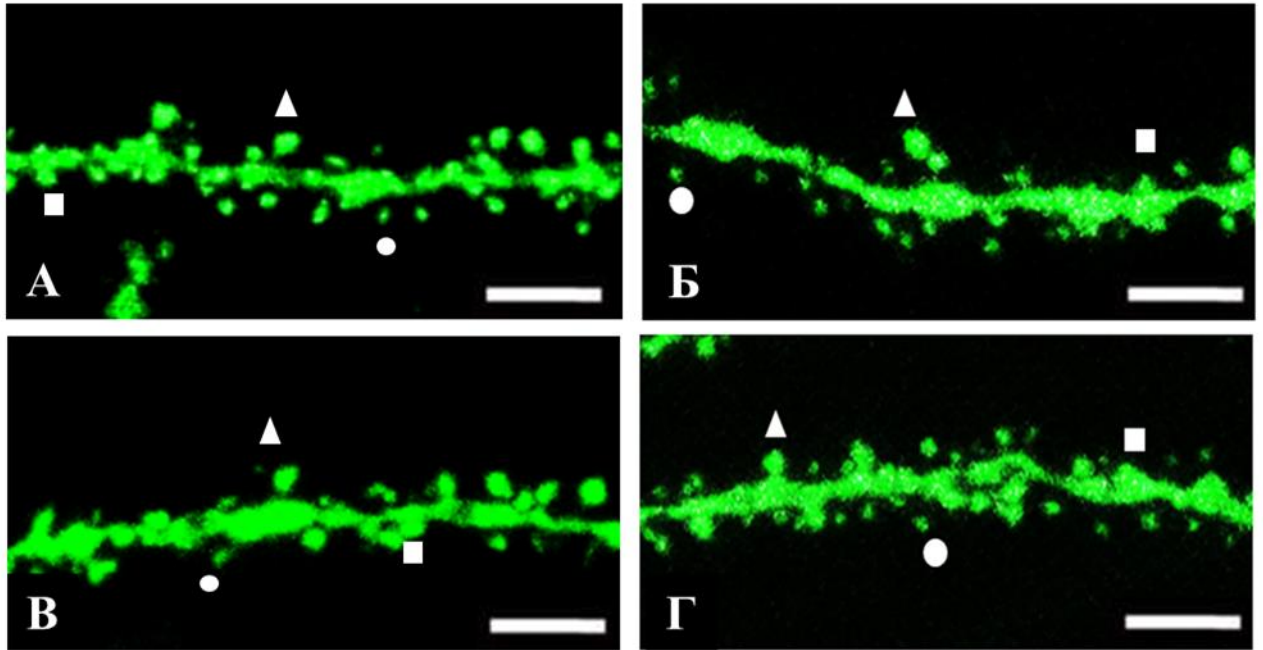


Рисунок 29 – Вторичные апикальные дендриты нейронов СА1 гиппокампа в мозге мышей-самок мышей линий М (контроль, А) и 5xFAD-М в возрасте 5 месяцев, которым вводили пептиды EDR (В), KED (Г) и физиологический раствор (Б). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Зеленый цвет соответствует экспрессии зеленого флуоресцентного белка. x1000. Обозначения: круг – тонкий шипик, треугольник – грибовидный шипик, квадрат – пеньковый шипик.

Таблица 8

Морфологические параметры дендритных шипиков нейронов гиппокампа у самок мышей линий М и 5xFAD-М в возрасте 5 месяцев под воздействием коротких пептидов и физиологического раствора

Параметр	М + ФР (контроль)	5xFAD-М+ФР	5xFAD- М+EDR	5xFAD- М+KED
<b>DSD, шипиков/10 мкм</b>	13.39±0.53	11.74±0.49*	13.31 ± 0.51*	11.24 ± 0.33
<b>MS, %</b>	43.94±1.44	35.60±1.62***	36.35 ± 1.43	39.66 ± 2.09
<b>TS, %</b>	42.65±1.69	51.38±1.76***	48.45 ± 1.86	44.18 ± 2.99*
<b>SS, %</b>	13.31±0.98	12.63±1.05	15.86 ± 1.01	16.12 ± 1.50

Примечание: данные указаны в формате среднее±ошибка среднего. \*, \*\*, \*\*\* – p<0.05, p<0.01, p<0.001 по сравнению с мышами контрольной группы.

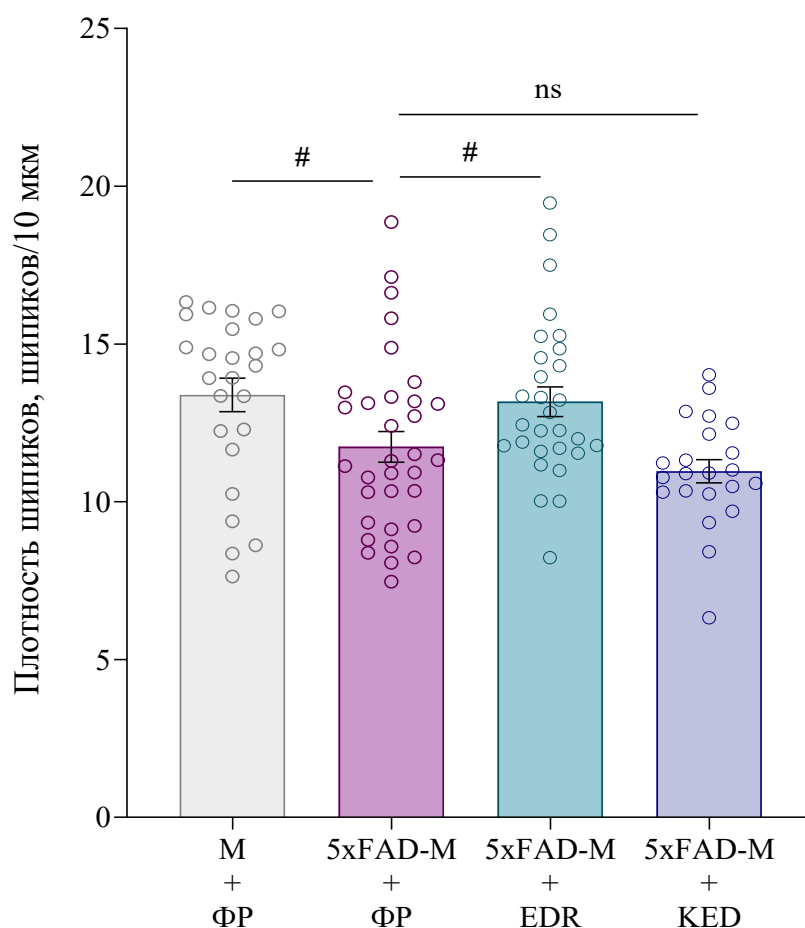


Рисунок 30 – Доля дендритных шипиков на 10 мкм длины дендритов нейронов CA1 области гиппокампа у мышей под воздействием коротких пептидов и физиологического раствора. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круги), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы).

# –  $p < 0,05$  по сравнению с мышами линии 5xFAD-M, которым вводили физиологический раствор; ns – статистически не значимо.

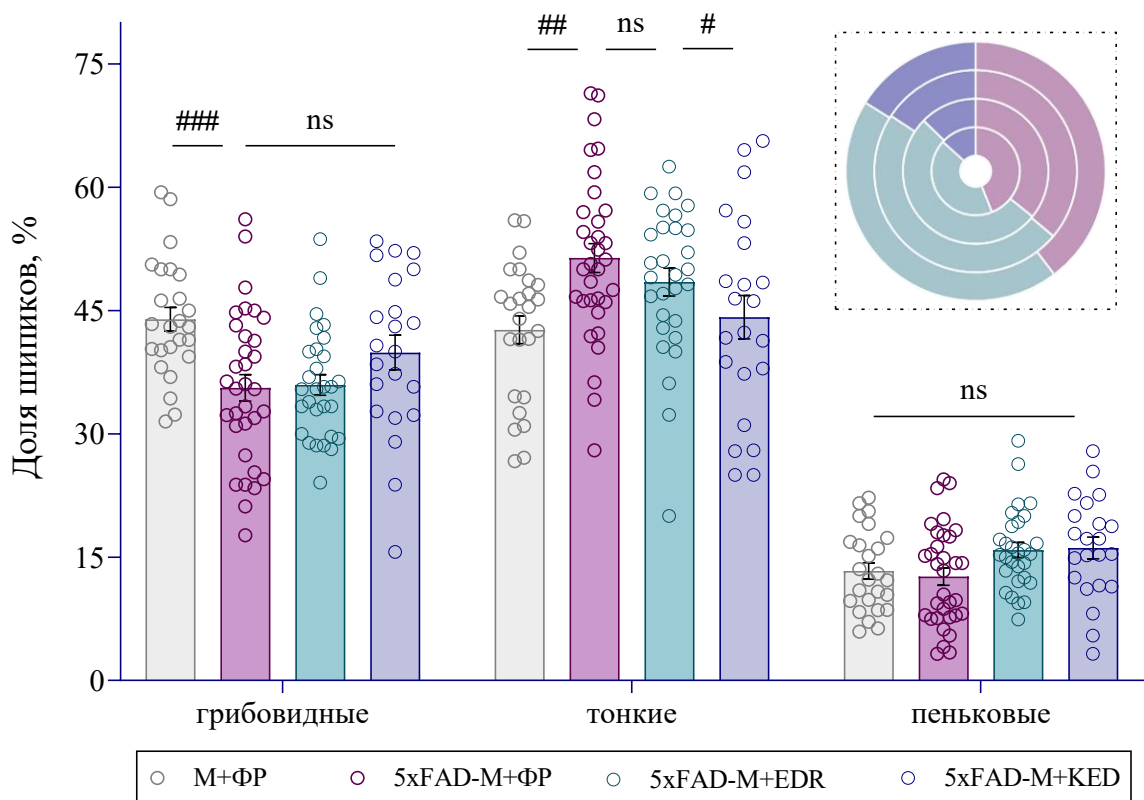


Рисунок 31 – Доля дендритных шипиков каждого типа на нейронах CA1 области гиппокампа у самок. Данные представлены в виде индивидуальных значений (круг), среднего значения (высота столбцов) и ошибки среднего (усы). Круговые диаграммы отражают долю каждого типа шипиков от общего количества: от центра к периферии данные соответствуют группам на графике слева направо. Цвет на круговой диаграмме соответствует типу шипика: зеленый – тонкий тип, лиловый – грибовидный тип, синий – пеньковый тип.

# –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ns – статистически не значимо.

Таким образом, у мышей-самок линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес, наблюдалось снижение плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа за счет элиминации грибовидных шипиков памяти. При этом из двух исследуемых пептидов у мышей-самок линии 5xFAD-M только пептид EDR проявлял нейропротекторный эффект, который заключался в нормализации плотности дендритных шипиков нейронов у мышей-самок

данной линии. Однако изменений количества грибовидных шипиков у мышей-самок данной линии под действием пептида EDR выявлено не было.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, которое приводит к потере памяти. БА характеризуется изменением функционального состояния нейронных сетей в областях мозга, ответственных за формирование памяти, которое отражается в нарушении формирования синаптических контактов или потере их стабильности. Короткие пептиды являются перспективными нейропротекторными соединениями ввиду высокой биологической активности и отсутствия побочных эффектов.

В настоящей работе разработан скрининговый подход, в ходе которого из ряда пептидных соединений пептид EDR был определен как наиболее перспективный короткий пептид для разработки фармацевтического средства для профилактики и лечения болезни Альцгеймера у человека. Реализация данного подхода позволяет заключить, что при разработке лекарственного средства для профилактики и лечения БА у человека пептид EDR может оказать терапевтический эффект за счет воздействия на широкий спектр генетических мишеней, вовлеченных в развитие патологии и связанных с ключевыми биологическими функциями: окислительным фосфорилированием, регуляцией окислительного стресса, метаболизмом амилоида, функционированием микротрубочек, кальциевым сигналингом, транспортом глюкозы и апоптозом. Это, в свою очередь, указывает на потенциальный полифункциональный характер действия пептида EDR при БА у человека, что является весомым преимуществом по сравнению с действием известных терапевтических агентов для лечения этой патологии.

Для оценки потенциальной эффективности пептида EDR при БА были проведены исследования *in vivo* на трансгенных моделях данного заболевания,

а в качестве пептида сравнения рассматривали пептид KED ввиду его вазопротекторных свойств. В качестве оцениваемых параметров были выбраны характеристики, наиболее тесно связанные с механизмами нарушения памяти при БА на ранних стадиях развития заболевания, а именно синаптическая пластичность и морфология дендритных шипиков нейронов гиппокампа. В частности, была произведена электрофизиологическая оценка формирования долговременной потенциации, морфологический анализ общей плотности и процентного соотношения основных функциональных типов дендритных шипиков.

При оценке формирования долговременной потенциации была выявлена тенденция возрастания показателя ДВП при последовательном переходе от группы 5xFAD к группам EDR, WT и KED. Это свидетельствует о нарушении нейропластичности у мышей в возрасте 4 мес, что согласуется с литературными данными о фенотипических различиях в ДВП у мышей данной линии и мышей дикого типа [Wang M. et al., 2019]. Кроме того, выраженная тенденция к увеличению ДВП у мышей линии 5xFAD под действием пептида KED свидетельствует о возможной способности данного пептида восстанавливать нейропластичность на ранней стадии БА.

Для изучения патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов гиппокампа при БА под влиянием коротких пептидов в ходе кросс-бридинга была выведена трансгенная линия мышей 5xFAD-M. У этих животных в возрасте с 4 до 5 месяцев выявлено снижение доли грибовидных шипиков, что согласуется с литературными данными об утрате синапсов в патогенезе БА.

При оценке эффективности пептиды EDR и KED продемонстрировали нейропротекторные свойства в модели БА *in vivo*. Введение пептида EDR способствовало увеличению количества дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита в CA1 области гиппокампа у мышей 5xFAD-M, что может свидетельствовать о его способности стимулировать образование новых

синаптических связей между нейронами. Введение пептида KED привело к росту количества дендритных шипиков грибовидного типа в CA1 области гиппокампа у мышей трансгенной линии 5xFAD-M, которые считаются функционально активными постсинаптическими структурами.

Важным аспектом проведенного исследования является подтверждение морфофункциональных изменений нейронов при развитии БА, описанных в литературе [Terry R.D. et al., 1991; Serrano-Pozo A. et al., 2011]. В частности, нарушение нейропластичности коррелирует со снижением количества грибовидных дендритных шипиков. При этом систематическое введение пептида KED способствует формированию положительной тенденции к восстановлению нейропластичности при БА и предупреждает элиминацию функциональных синаптических связей, что выражается в поддержании фракции наиболее функциональных дендритных шипиков грибовидного типа.

Выявлены гендер-ассоциированные различия в нейропротекторных эффектах пептидов при БА. Так, пептиды EDR и KED способствовали более выраженному восстановлению синаптических контактов при БА у самцов, что может быть связано с исходно более выраженной патологией БА у мышей данного пола. В связи с тем, что пептиды EDR и KED являются биорегуляторами, их эффект может носить модулирующий характер в зависимости от тяжести патологии, как это было выявлено ранее у пептидов виллона (KE) и эпиталона (AEDG) в отношении относительной длины теломер лимфоцитов крови человека [Хавинсон В.Х. и др., 2019 а,б] и у пептида EDR на условно-рефлекторную деятельность медоносной пчелы *Apis mellifera* [Хавинсон В.Х. и др., 2015].

Одним из возможных объяснений половых различий в развитии БА может являться различный гормональный статус самцов и самок, оказывающий влияние на количество и морфологию дендритных шипиков при БА [Skaper S.D. et al., 2017]. На ранних стадиях развития БА эстроген может оказывать нейропротекторный эффект. Выявлено, что митохондрии молодых

самок лучше защищены от повреждений, вызванных токсичным эффектом бета-амилоида. У молодых самок в митохондриях снижена выработка активных форм кислорода и высвобождение проапоптотических сигнальных молекул по сравнению с молодыми самцами [Lloret A. et al., 2008]. Кроме того, эстроген оказывает влияние на гиппокамп-ассоциированные механизмы синаптической пластичности и механизмы формирования дендритных шипиков [Mukai H. et al., 2010].

В литературе имеются сведения о половых различиях в течении БА у мужчин и женщин. Женщины подвержены большему риску развития деменции при БА, тогда как мужчины подвергаются большему риску развития сосудистой деменции [Podcasy J.L., Epperson C.N., 2016]. У мышей линии 5xFAD, начиная с возраста 4-х мес, наблюдается развитие цереброваскулярной патологии [Giannoni P. et al., 2016], которая заключается в том, что в результате нарушения функционирования нейроваскулярной единицы уменьшается мозговой кровоток, снижается поступление питательных веществ, нарушается клиренс амилоида, что приводит к гибели нейронов, и, как следствие, развитию деменции [Nelson A.R. et al., 2016].

Ввиду того, что пептид KED синтезирован на основе анализа аминокислотного состава полипептида, выделенного из сосудов телят, и в культуре эндотелиоцитов аорты, полученной от пациентов с атеросклерозом способствовал увеличению экспрессии фактора роста сосудов (VEGF) [Малинин В.В. и др., 2014], можно полагать, что нейропротекторное действие пептида KED связано с его способностью предупреждать развитие нейроваскулярной дегенерации при развитии БА. Следует отметить, что фактор роста эндотелиоцитов необходим для функционирования сосудистого и нейронального компонента головного мозга [Religa P. et al., 2013], [Lange C. et al., 2016].

Следует отметить, что полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшей разработки данной

темы, а именно изучения эффективности коротких пептидов в отношении коррекции когнитивных нарушений в модели болезни Альцгеймера.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан скрининговый подход, в ходе которого из ряда пептидных соединений пептид EDR определен как наиболее перспективный короткий пептид для разработки фармацевтического средства для профилактики и лечения болезни Альцгеймера у человека. В соответствии с разработанным подходом выявлено, что потенциальными мишенями нейропротекторного действия короткого пептида EDR являются промоторные зоны генов, вовлеченных в развитие болезни Альцгеймера и связанных с ключевыми биологическими процессами: окислительным фосфорилированием, регуляцией окислительного стресса, метаболизмом амилоида, функционированием микротрубочек, кальциевым сигналингом, транспортом глюкозы и апоптозом.

2. При курсовом введении пептидов EDR и KED мышам линии 5xFAD в течение 2 месяцев, начиная с 2-месячного возраста, не выявлено достоверного изменения относительного угла наклона восходящей фазы пВПСП в возрасте 4 месяцев по сравнению с контрольной группой мышей линии 5xFAD соответствующего возраста, которым вводили физиологический раствор. Введение пептида KED мышам линии 5xFAD в течение 2 месяцев, начиная с 2-месячного возраста, способствовало развитию тенденции к восстановлению показателя синаптической пластичности в возрасте 4 месяцев до уровня нормы.

3. Методом кросс-бридинга выведена трансгенная линия мышей 5xFAD-M, которая пригодна для анализа прогрессирующей синаптической дегенерации при болезни Альцгеймера *in vivo*.

4. В возрасте 5 месяцев как у самцов, так и у самок мышей линии 5xFAD-M плотность дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа снижена на 15% и 12%, соответственно, относительное количество

дендритных шипиков грибовидного типа снижено на 21% и 19%, соответственно, относительное количество дендритных шипиков тонкого типа увеличено на 19% и 17%, соответственно, по сравнению с указанными показателями у мышей контрольной линии М соответствующего пола.

5. При курсовом введении пептида EDR в течение 2 месяцев, начиная с 3-месячного возраста, самцам мышей линии 5xFAD-M наблюдается увеличение плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа на 13% и увеличение относительного количества дендритных шипиков грибовидного типа на 25% в возрасте 5 месяцев по сравнению с контролем. Курсовое введение пептида KED самцам мышей линии 5xFAD-M приводит к увеличению плотности дендритных шипиков на 22% и относительного количества грибовидных шипиков на 27% в возрасте 5 месяцев по сравнению с контролем.

6. При курсовом введении пептида EDR в течение 2 месяцев, начиная с 3-месячного возраста, самкам мышей линии 5xFAD-M наблюдается увеличение плотности дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа на 12% в возрасте 5 мес по сравнению с контролем. Введение пептида KED самкам мышей линии 5xFAD-M способствует снижению дендритных шипиков тонкого типа на 14% в возрасте 5 мес по сравнению с соответствующим контролем.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<b>АХЭ</b>	ацетилхолинэстераза
<b>БА</b>	болезнь Альцгеймера
<b>ВЧС</b>	высокочастотная стимуляция
<b>ГЭБ</b>	гематоэнцефалический барьер
<b>ДВП</b>	долговременная потенция
<b>ДНК</b>	дезоксирибонуклеиновая кислота
<b>НВЕ</b>	нейроваскулярная единица
<b>МП</b>	мембранный потенциал
<b>пВПСП</b>	полевой возбуждающий постсинаптический потенциал
<b>ПД</b>	потенциал действия
<b>п.о.</b>	пары оснований
<b>ПСП</b>	постсинаптическая плотность
<b>ПЦР</b>	полимеразная цепная реакция
<b>СМЖ</b>	спинномозговая жидкость
<b>ФР</b>	физиологический раствор
<b>А<math>\beta</math></b>	$\beta$ -амилоид
<b>А<math>\beta</math>О</b>	олигомерная форма $\beta$ -амилоида
<b>АМРА</b>	$\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
<b>АРОЕ <math>\epsilon</math>4</b>	аллель $\epsilon$ 4 гена белка аполипопротеина
<b>APP</b>	белок-предшественник амилоида

<b>BACE1</b>	фермент первого типа, расщепляющий APP в сайте $\beta$
<b>CA</b>	область гиппокампа
<b>cAMP</b>	циклический аденозинмонофосфат
<b>CaMKII</b>	кальмодулин-зависимая киназа второго типа
<b>CREB</b>	цАМФ-зависимый белок-связывающий элемент
<b>CTF</b>	связанный с мембраной с-концевой фрагмент
<b>FAD</b>	семейная форма болезни Альцгеймера
<b>GFP</b>	зеленый флуоресцентный белок
<b>GO</b>	онтология генов
<b>LRP1</b>	белок 1 типа, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности
<b>MAP</b>	митоген-активируемая протеин-киназа
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	этилендиаминтетрауксусная кислота
<b>PI3</b>	фосфатидилинозитол-3-киназа
<b>PK</b>	протеинкиназа
<b>PSEN</b>	семейство белков пресенилинов
<b>SNET</b>	буфер для лизиса клеточных и ядерных мембран
<b>SAD</b>	спорадическая форма БА
<b>sAPP</b>	растворимый предшественник амилоида
<b>VEGF</b>	фактор роста эндотелиоцитов
<b>VGCC</b>	потенциал-зависимые кальциевые каналы

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Скрининговый подход может быть модифицирован и распространен на другие патологии, для которых целесообразна разработка терапевтических средств.

2. Выведенная трансгенная линия мышей 5xFAD-M может быть использована для изучения механизмов прогрессирующей синаптической дегенерации при болезни Альцгеймера *in vivo*, а также тестирования потенциальных соединений для фармакотерапии данной патологии

3. Короткие пептиды EDR и KED рекомендованы для дальнейшего изучения в качестве активных соединений для разработки терапевтического средства для профилактики и лечения болезни Альцгеймера.

## УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Башкирева А.С., Артамонова В.Г. Пептидергическая коррекция невротических состояний у водителей грузового автотранспорта // Успехи геронтологии. 2012. Т. 25, № 4. С. 718–728.
- 2) Кузнецова Т.Г., Голубева И.Ю., Трофимова С.В. и др. Влияние трипептида Пинеалона на реабилитацию когнитивных функций в процессе старения на примере макак-резусов (*Macaca Mulatta*) // Вестн. Московского ун-та. Антропология. 2019. № 1. С. 62–73.
- 3) Малинин В.В., Дурнова А.О., Полякова В.О., Кветной И.М. Влияние пептида Lys-Glu-Trp на межклеточные взаимодействия и пролиферацию эндотелия сосудов в норме и при атеросклерозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157, № 3. С. 298–300.
- 4) Сибаров Д.А., Коваленко Р.И., Ноздрачев А.Д. и др. Влияние пептидов эпифиза на спонтанную электрическую активность пианеалоцитов крыс. // Доклады АН. 2002. Т. 385. № 4. С. 568–570.
- 5) Ткаченко Т.Б. Нарушения микроциркуляции пародонта при гингивитах и пародонтитах легкой степени и их фармакологическая коррекция: Автореф. дис. канд. мед. наук. СПб., 1999. 16 с.
- 6) Хавинсон В.Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. Клиническая медицина. 2020. Т. 98, № 3. С. 165–177.
- 7) Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные геропротекторы — эпигенетические регуляторы физиологических функций организма. Санкт-Петербург: Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена. 2014. 271 с.
- 8) Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Кветной И.М., Кветная Т.В., Полякова В.О., Корф Х. Молекулярно-клеточные механизмы пептидной регуляции синтеза мелатонина в культуре пинелоцитов // Бюл. экспер. биол. 2012. Т. 153, № 2. С. 223–226.
- 9) Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Пендина А.А., Ефимова О.А., Кольцова А.С., Крапивин М.И., Тихонов А.В., Петрова Л.И., Петровская-

Каминская А.В., Баранов В.С. Изучение влияния пептида КЕ на длину теломер хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов человека // VII Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии». 2019а. С. 166–168.

10) Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Умнов Р.С. Пептид КЕД: Молекулярно-генетические аспекты регуляции нейрогенеза при болезни Альцгеймера // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 171, № 2. С. 150–154.

11) Хавинсон В.Х., Лопатина Н.Г., Чалисова Н.И., Зачепило Т.Г., Линькова Н.С., Халимов Р.И., Камышев Н.Г. Трипептид модулирует условно-рефлекторную деятельность медоносной пчелы *Apis mellifera* L. // Биологические науки. 2015. № 2. С. 492–496.

12) Хавинсон В.Х., Пендина А.А., Ефимова О.А., Тихонов А.В., Кольцова А.С., Крапивин М.И., Петровская-Каминская А.В., Петрова Л.И., Линькова Н.С., Баранов В.С. Влияние пептида АЕДГ на длину теломер и митотический индекс ФГА-стимулированных лимфоцитов крови человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2019б. № 3. С. 175–178.

13) Чалисова Н.И., Зачепило Т.Г., Камышев Н. Г., Лопатина Н. Г. Влияние трипептида Lys-Glu-Asp на физиологическую активность клеток нейроиммуноэндокринной системы // Клет. техн. биол. мед. 2012. № 2. С. 98–101.

14) Abagyan R., Orry A., Raush E., Totrov M. What constitutes a good docking score? // ICM-Pro User Guide v.3.8: MolSoft LLC, USA, 2018.

15) Aghajanian G.K., Rasmussen K. Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices // Synapse. 1989. Vol. 3, № 4. P. 331–338.

16) Aitken P.G. Kainic acid and penicillin: differential effects on excitatory and inhibitory interactions in the CA1 region of the hippocampal slice // Brain Res. 1985. Vol. 325, № 1-2. P. 261–269. doi:10.1016/0006-8993(85)90322-1.

- 17) Albeni B.C., Oliver D.R., Toupin J., Odero G. Electrical stimulation protocols for hippocampal synaptic plasticity and neuronal hyper-excitability: are they effective or relevant? // *Exp Neurol.* 2007. Vol. 204, № 1. P. 1–13. doi:10.1016/j.expneurol.2006.12.009.
- 18) Amtul Z., Atta-Ur-Rahman. Neural plasticity and memory: molecular mechanism // *Rev Neurosci.* 2015. Vol. 26, № 3. P. 253–268. doi:10.1515/revneuro-2014-007514.
- 19) Andersen P., Bliss T.V., Skrede K.K. Unit analysis of hippocampal population spikes // *Exp Brain Res.* 1971. Vol. 13, № 2. P. 208–221. doi:10.1007/BF00234086.
- 20) Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T., O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press. 2009. 852 p. doi:10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001.
- 21) Arutjunyan A., Kozina L., Stvolinskiy S., Bulygina Y., Mashkina A., Khavinson V. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia // *International Journal of Clinical Experimental Medicine.* 2012. Vol. 5, № 2. P. 179–185.
- 22) BACE1 information // *The Human Protein Atlas*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186318-BACE1> (дата обращения 16.03.2023)
- 23) Balestrino M., Aitken P.G., Somjen G.G. The effects of moderate changes of extracellular K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on synaptic and neural function in the CA1 region of the hippocampal slice // *Brain Res.* 1986. Vol. 377, № 2. P. 229–239. doi:10.1016/0006-8993(86)90863-2.
- 24) Baltaci S.B., Mogulkoc R., Baltaci A.K. Molecular Mechanisms of Early and Late LTP // *Neurochem Res.* 2019. Vol. 44, № 2. P. 281–296. doi:10.1007/s11064-018-2695-424.
- 25) Belinky F., Nativ N., Stelzer G., Zimmerman S., Iny Stein T., Safran M., Lancet D. PathCards: multi-source consolidation of human biological pathways.

Database (Oxford). 2015. doi: 10.1093/database/bav006.

26) Betschel S.D., Warrington R.J., Schellenberg R. Clinical Experience with Octagam® 10 %, a solvent detergent virus inactivated intravenous immunoglobulin: a Canadian retrospective review of utilization // *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2016. Vol. 12, № 32. doi: 10.1186/s13223-016-0138-9

27) Bhadbhade A., Cheng D.W. Amyloid Precursor Protein Processing in Alzheimer's Disease // *Iran. J. Child Neurol.* 2012. № 6. P. 1–4. doi: 10.22037/ijcn.v6i1.2924.

28) Bourne J.N., Harris K.M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines // *Annu Rev Neurosci.* 2008. № 31 P. 47–67. doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646.

29) Buzsáki G., Anastassiou C.A., Koch C. The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes // *Nat Rev Neurosci.* 2012. Vol. 13, № 6. P. 407–420. doi:10.1038/nrn3241.

30) Chen G.F., Xu T.H., Yan Y., Yu-ren Zhou, Yi Jiang, Melcher K., Xu H.E. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development // *Acta Pharmacol Sin.* 2017. Vol. 38, № 9. P. 1205–1235. doi:10.1038/aps.2017.28.

31) Chidambaram S.B., Rathipriya A.G., Bolla S.R., Bhat A., Ray B., Mahalakshmi A. M., Manivasagam T., Thenmozhi A.J., Musthafa M. E., Guillemin G.J., Chandra R., Sakharkar M.S. Dendritic spines: Revisiting the physiological role. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2019. № 92. P. 161–193. doi:10.1016/j.pnpbp.2019.01.005.

32) Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite G, Pangalos MN. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jun;13(6):419-31. doi: 10.1038/nrd4309. Epub 2014 May 16. PMID: 24833294.

33) Cronin T., Arshad Q., Seemungal B.M. Vestibular deficits in neurodegenerative disorders: balance, dizziness, and spatial disorientation // *Front. Neurol.* 2017. Vol. 8, № 538. doi: 10.3389/fneur.2017.00538.

- 34) Crouzin N., Baranger K., Cavalier M., Marchalant Y., Cohen-Solal C., Roman F.S., Khrestchatsky M., Rivera S., Féron F., Vignes M. Area-specific alterations of synaptic plasticity in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: dissociation between somatosensory cortex and hippocampus // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 9. e74667. doi:10.1371/journal.pone.0074667
- 35) Csermely P, Korcsmáros T, Kiss HJ, London G, Nussinov R. Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2013 Jun;138(3):333-408. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.016. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23384594; PMCID: PMC3647006.
- 36) Cummings J. Anti-amyloid monoclonal antibodies are transformative treatments that redefine Alzheimer's disease therapeutics // *Drugs*. 2023. № 83. P. 569–576.
- 37) Di Marco L.Y., Venneri A., Farkas E., Evans P.C., Marzo A., Frangi A.F. Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease--A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles // *Neurobiol Dis*. 2015. №. 82. P. 593–606. doi:10.1016/j.nbd.2015.08.014.
- 38) Eimer W.A., Vassar R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation // *Mol Neurodegener*. 2013. №. 8. doi:10.1186/1750-1326-8-2.
- 39) Endres K., Fahrenholz F., Lotz J., Hiemke C., Teipel S., Lieb K., Tüscher O., Fellgiebel A. Increased CSF APPs- $\alpha$  levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin // *Neurology*. 2014. Vol. 83, № 21. P. 1930–1935.
- 40) Eremin K.O., Kudrin V.S., Saransaari P., Oja S.S., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Rayevsky K.S. Semax, an ACTH(4-10) analogue with nootropic properties, activates dopaminergic and serotonergic brain systems in rodents // *Neurochem. Res*. 2005. Vol. 30. № 12. P. 1493–1500.

- 41) Fan L., Mao C., Hu X., Zhang S., Yang Z., Hu Z., Sun H., Fan Y., Dong Y., Yang J., Shi C., Xu Y. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease // *Front Neurol.* 2020. № 10. 1312.
- 42) Feliciano P., Andrade R., Bykhovskaia M. Synapsin II and Rab3a cooperate in the regulation of epileptic and synaptic activity in the CA1 region of the hippocampus // *J Neurosci.* 2013. Vol. 33, №. 46. P. 18319–18330. doi:10.1523/JNEUROSCI.5293-12.2013.
- 43) Feltes B.C., Poloni J.F., Nunes I.J.G., Faria S.S., Dorn M. Multi-Approach Bioinformatics Analysis of Curated Omics Data Provides a Gene Expression Panorama for Multiple Cancer Types // *Front Genet.* 2020. № 11. doi: 10.3389/fgene.2020.586602.
- 44) Feng G., Mellor R.H., Bernstein M., Keller-Peck C., Nguyen Q.T., Wallace M., Nerbonne J.M., Lichtman J.W., Sanes J. R. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP // *Neuron.* 2000. Vol. 28, № 1. P. 41–51. doi:10.1016/s0896-6273(00)00084-2.
- 45) Ferreira-Vieira T.H., Guimaraes I.M., Silva F.R., Ribeiro F.M. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System // *Curr Neuropharmacol.* 2016. Vol. 14, №. 1. P. 101–115. doi:10.2174/1570159x13666150716165726.
- 46) Gao Y., Tan L., Yu J.T., Tan L. Tau in Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies // *Curr Alzheimer Res.* 2018. Vol. 15, № 3. P. 283–300.
- 47) Giannoni P., Arango-Lievano M., Neves I.D., Rousset M.C., Baranger K., Rivera S., Jeanneteau F., Claeysen S., Marchi N. Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease // *Neurobiol Dis.* 2016. № 88. P. 107–117. doi:10.1016/j.nbd.2016.01.001.
- 48) Grover L.M., Kim E., Cooke J.D., Holmes W.R. LTP in hippocampal area CA1 is induced by burst stimulation over a broad frequency range centered around delta // *Learn Mem.* 2009. Vol. 16, № 1. P. 69–81.

- 49) Hardy J.A., Higgins G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis // *Science*. 1992. Vol. 256, № 5054. P. 184–185. doi:10.1126/science.1566067.
- 50) Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease // *Nat Rev Neurosci*. 2015. Vol. 16, № 6. P. 358–372. doi:10.1038/nrn3880.
- 51) Hering H., Sheng M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation // *Nat Rev Neurosci*. 2001. Vol. 2, № 12. P. 880–888. doi:10.1038/35104061.
- 52) Jain B, Raj U, Varadwaj PK. Drug Target Interplay: A Network-based Analysis of Human Diseases and the Drug Targets. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(13):1053-1061. doi: 10.2174/1568026618666180719160922.
- 53) Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T.A., Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A $\beta$  aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease // *Neurobiol Aging*. 2012. Vol. 33, № 1. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027.
- 54) Khavinson V., Ribakova Y., Kulebiakin K. et al. Pinealon increases cell viability by suppression of free radical levels and activating proliferative processes // *Rejuvenation res*. 2011. Vol. 14, № 5. P. 535–541.
- 55) Khavinson V. Kh., Goncharova N., Lapin B. Synthetic tetrapeptide epitagon restores disturbed neuroendocrine regulation in senescent monkeys // *Neuroendocr. Lett*. 2001. Vol. 22. P. 251–254.
- 56) Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation. Basel (Switzerland): Karger AG. 2005;104.
- 57) Khavinson V.Kh., Pronyaeva V.E., Linkova N.S. et al. Molecular-Physiological Aspects of Peptide Regulation of the Function of the Retina in Retinitis Pigmentosa. // *Human Physiology*. 2014. Vol. 40. № 1. P. 153–158.

- 58) Klausberger T. GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus // *Eur J Neurosci*. 2009. Vol. 30, № 6. P. 947–957. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06913.x.
- 59) Kopanitsa M. V., Afinowi N.O., Grant S.N. Recording long-term potentiation of synaptic transmission by three-dimensional multi-electrode arrays // *BMC Neurosci*. 2006. Vol. 7. C. 61.
- 60) Kraskovskaya N.A., Kukanova E.O., Lin'kova N.S., Popugaeva E.A., Khavinson V.K. Tripeptides Restore the Number of Neuronal Spines under Conditions of In Vitro Modeled Alzheimer's Disease // *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2017. № 2. P. 550–553.
- 61) Lacosta A.M., Pascual-Lucas M., Pesini P., Casabona D., Pérez-Grijalba V., Marcos-Campos I., Sarasa L., Canudas J., Badi H., Monleón I., San-José I., Munuera J., Rodríguez-Gómez O., Abdelnour C., Lafuente A., Buendía M., Boada M., Tárraga L., Ruiz A., Sarasa M. Safety, tolerability and immunogenicity of an active anti-A $\beta$ 40 vaccine (ABvac40) in patients with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I trial // *Alzheimers Res Ther*. 2018. № 10. P. 1–12.
- 62) Lange C., Storkebaum E., de Almodóvar C.R., Dewerchin M., Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases // *Nat Rev Neurol*. 2016. Vol. 12, № 8. P. 439–454. doi:10.1038/nrneurol.2016.88.
- 63) Larson J., Munkácsy E. Theta-burst LTP // *Brain Res*. 2015. № 1621. P. 38–50. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.034.
- 64) Larson J., Wong D., Lynch G. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation // *Brain Res*. 1986. Vol. 368, № 2. P. 347–350. doi:10.1016/0006-8993(86)90579-2.
- 65) Li N., Li Y., Li L.J., Zhu K., Zheng Y., Wang X.M. Glutamate receptor delocalization in postsynaptic membrane and reduced hippocampal synaptic

plasticity in the early stage of Alzheimer's disease // *Neural Regen Res.* 2019. Vol. 14, № 6. P. 1037–1045. doi:10.4103/1673-5374.25062556.

66) Lloret A., Badía M.C., Mora N.J., Ortega A., Pallardó F., Alonso M-D., Atamna H., Viña J. Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease // *Free Radic Biol Med.* 2008. Vol. 44, № 12. P. 2019–2025. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.017.

67) Lue L.-F., Kuo Y.-M., Roher A., Brachova L., Shen Y., Sue L., Beach T., Kurth J.H., Rydel R.E., Rogers J. Soluble amyloid  $\beta$  peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease // *Am. J. Pathol.* 1999. № 155. P. 853–862.

68) Lynch C. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia, a global surge // *Alzheimer's Dement.* 2020. Vol. 16, № 10. e038255.

69) Lynch G., Kramar E.A., Rex C.S., Jia Y., Chappas D., Gall C.M., Simmons D.A. Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease // *J Neurosci.* 2007. Vol. 27, № 16. P. 4424–4434. doi:10.1523/JNEUROSCI.5113-06.2007.

70) Mathis D.M., Furman J.L., Norris C.M. Preparation of acute hippocampal slices from rats and transgenic mice for the study of synaptic alterations during aging and amyloid pathology // *J Vis Exp.* 2011. № 49. P. 23–30. doi:10.3791/2330.

71) Mehta D., Jackson R., Paul G., Shi J., Sabbagh M. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010–2015 // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2017. № 26. P. 735–739.

72) Michaels T.T., Šarić A., Curk S., Bernfur K., Arosio P., Meisl G., Dear A.J., Cohen S.A., Dobson C.M., Vendruscolo M., Linse S., Knowles T.J. Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer's A $\beta$ 42 peptide // *Nat Chem.* 2020. Vol. 12, № 5. P. 445–451. doi:10.1038/s41557-020-0452-1.

73) Morozov V.G., Khavinson V.Kh. Natural and synthetic thymic peptides as therapeutics for immune dysfunction // *Int J. Immunopharmac.* 1997. Vol. 9, №

19. P. 501–505. doi:10.1016/s0192-0561(97)00058-1.

74) Mukai H., Kimoto T., Hojo Y., Kawato S., Murakami G., Higo S., Hatanaka Y., Ogiue-Ikeda M. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus // *Biochim Biophys Acta*. 2010. Vol. 1800, № 10. P. 1030–1044. doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.002.

75) Nelson A.R., Sweeney M.D., Sagare A.P., Zlokovic B.V. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease // *Biochim Biophys Acta*. 2016. Vol. 1862, № 5. P. 887–900. doi:10.1016/j.bbadis.2015.12.016.

76) Neves M.A., Totrov M., Abagyan R. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement // *J Comput Aided Mol Des*. 2012. Vol. 26. P. 675–686.

77) Nomura T., Oyamada Y., Fernandes H.B., Remmers C.L., Xu J., Meltzer H.Y., Contractor A. Subchronic phencyclidine treatment in adult mice increases GABAergic transmission and LTP threshold in the hippocampus // *Neuropharmacology*. 2016. № 100. P. 90–97. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.04.012.

78) O'Leary T.P., Robertson A., Chipman P.H., Rafuse V.F., Brown R.E. Motor function deficits in the 12 month-old female 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease // *Behav. Brain Res*. 2018. Vol. 337. P. 256–263.

79) Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation // *J Neurosci*. 2006. Vol. 26., № 40. P. 10129–10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006.

80) Orr A.L., Clark J.K., Madison D.V. Differential Inhibition of E-S Potentiation and Long-term Potentiation by Cell-derived and Arctic Amyloid Beta // *bioRxiv* 601492. 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/601492> 96.

- 81) Palmqvist S., Schöll M., Strandberg O., Mattsson N., Stomrud E., Zetterberg H., Blennow K., Landau S., Jagust W., Hansson O. Earliest accumulation of  $\beta$ -amyloid occurs within the default-mode network and concurrently affects brain connectivity // *Nat. Commun.* 2014. Vol., № 8. 1214. doi: 10.1038/s41467-017-01150-x.
- 82) Pchitskaya E., Bezprozvanny I. Dendritic Spines Shape Analysis- Classification or Clusterization? Perspective // *Front. Synaptic Neurosci.* 2020. № 12. P. 31. doi: 10.3389/fnsyn.2020.00031
- 83) Penke B., Szűcs M., Bogár F. Oligomerization and Conformational Change Turn Monomeric  $\beta$ -Amyloid and Tau Proteins Toxic: Their Role in Alzheimer's Pathogenesis // *Molecules.* 2020. Vol. 25, № 7. P. 1659. doi:10.3390/molecules25071659.
- 84) Périer R.C., Praz V., Junier T., Bonnard C., Bucher P. The eukaryotic promoter database (EPD) // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 1, № 28. P. 302–303. doi: 10.1093/nar/28.1.302.
- 85) Piaceri I., Nacmias B., Sorbi S. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease // *Front Biosci (Elite Ed).* 2013. Vol. 5, № 1. P. 167–177.
- 86) Podcasy J.L., Epperson C.N. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias // *Dialogues Clin Neurosci.* 2016. Vol. 18, № 4. P. 437–446.
- 87) Popugaeva E., Chernyuk D., Zhang H., Postnikova T.Y., Pats K., Fedorova E., Poroikov V., Zaitsev A.V., Bezprozvanny I. Derivatives of Piperazines as Potential Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease // *Mol Pharmacol.* 2019. Vol. 95, № 4. P. 337–348. doi:10.1124/mol.118.114348.
- 88) Popugaeva E., Pchitskaya E., Bezprozvanny I. Dysregulation of Intracellular Calcium Signaling in Alzheimer's Disease // *Antioxid Redox Signal.* 2018. Vol. 12, № 29. P. 1176–1188. doi: 10.1089/ars.2018.7506.
- 89) Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A.S., Mooney R. D., Platt M. L. *Neuroscience* // New York: Neuroscience. 2018. 959 p.

- 90) Qiu R., Liu R., Wills A.M., He P., Leurent C., Hajos-Korcsok E., Mendes da Costa L., Alexander R.C. PF-06648671—A novel gamma secretase modulator: safety, tolerability, pharmacokinetics, and effects on plasma amyloid-b levels following single oral ascending doses in healthy volunteers // *Alzheimer's Dement.* 2016. Vol. 12, № 7. P. 611–612.
- 91) Ramsay R.R., Popovic-Nikolicb M.R., Nikolic K., Uliassi E., Bolognesi M.L. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases // *Clin. Transl. Med.* 2018. Vol. 1, № 7. P. 3. doi: 10.1186/s40169-017-0181-2.
- 92) Religa P., Cao R., Religa D, Xue, Y., Bogdanovic N., Westaway D., Cao Y. VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival // *Sci Rep.* 2013. № 3. P. 20–53. doi:10.1038/srep02053.
- 93) Reyes-Garcia S.Z., de Almeida A.G., Ortiz-Villatoro N.N., Scorza F.A., Cavalheiro E.A., Scorza C.A. Robust Network Inhibition and Decay of Early-Phase LTP in the Hippocampal CA1 Subfield of the Amazon Rodent *Proechimys* // *Front Neural Circuits.* 2018. P. 12–81. doi:10.3389/fncir.2018.00081.
- 94) Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Dickstein D.L., Hof P.R., Wearne S.L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images // *PLoS One.* 2008. Vol. 3, № 4. e1997. doi:10.1371/journal.pone.0001997.
- 95) Runge K., Cardoso C, de Chevigny A. Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms // *Front Synaptic Neurosci.* 2020. № 12. P. 36. doi: 10.3389/fnsyn.2020.00036.
- 96) Sadleir K.R., Popovic J., Vassar R. ER stress is not elevated in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease // *J Biol Chem.* 2018. Vol. 293, № 48. P. 18434–18443. doi:10.1074/jbc.RA118.005769.

- 97) Santaguida P.S., Raina P., Booker L., Patterson C., Baldassarre F., Cowan D., Gault M., Levine M., Unsal A. Pharmacological treatment of dementia // *Évid. Rep. Technol. Assess. (Summ.)*. 2004. № 97. P. 1–16.
- 98) Scheltens P., Hallikainen M., Grimmer T., Duning T., Gouw A.A., Teunissen C.E., Wink A.M., Maruff P., Harrison J., van Baal C.M., Bruins S., Lues I., Prins N.D. Safety, tolerability and efficacy of the glutaminy cyclase inhibitor PQ912 in Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2a study // *Alzheimers Res Ther*. 2018. Vol. 10, № 1. P. 107.
- 99) Segal M. Dendritic spines: Morphological building blocks of memory // *Neurobiol Learn Mem*. 2017. № 138. P. 3–9. doi:10.1016/j.nlm.
- 100) Sekeres M.J., Winocur G., Moscovitch M. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation // *Neurosci Lett*. 2018. № 680. P. 39–53. doi:10.1016/j.neulet.2018.05.006.
- 101) Serrano-Pozo A., Frosch M.P., Masliah E., Hyman B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011. Vol. 1, № 1. a006189. doi:10.1101/cshperspect.a006189.
- 102) Skaper S.D., Facci L., Zusso M., Giusti P. Synaptic Plasticity, Dementia and Alzheimer Disease // *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2017. Vol. 16, № 3. P. 220–233. doi:10.2174/1871527316666170113120853.
- 103) Snel B, Bork P, Huynen MA. The identification of functional modules from the genomic association of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 30;99(9):5890-5. doi: 10.1073/pnas.092632599. PMID: 11983890; PMCID: PMC122872.
- 104) Sultzer D.L., Lim A.C., Gordon H.L., Yarns B.C., Melrose R.J. Cholinergic receptor binding in unimpaired older adults, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease dementia // *Alz Res Therapy*. 2022. Vol. 1, № 14. P. 25. doi: 10.1186/s13195-021-00954-w.

- 105) Sun X., Chen W.-D., Wang Y.-D.  $\beta$ -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Front. Pharmacol.* 2015. № 6. P. 221. doi: 10.3389/fphar.2015.00221.
- 106) Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives // *Biochim Biophys Acta.* 2014. Vol. 1842, № 8. P. 1219–1231. doi:10.1016/j.bbadis.2013.09.010.
- 107) Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., Mering C.V. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. D1, № 47. P. D607-D613. doi: 10.1093/nar/gky1131.
- 108) Terry R. D., Masliah E., Salmon D. P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L.A., Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment // *Annals of Neurology.* 1991. Vol. 30, № 4. P. 572–580.
- 109) Tetteh H., Lee J., Lee J., Kim J.G., Yang S. Investigating Long-term Synaptic Plasticity in Interlamellar Hippocampus CA1 by Electrophysiological Field Recording // *J Vis Exp.* 2019. № 150. 10.3791/59879. doi:10.3791/59879.
- 110) Thinakaran G., Koo E.H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function // *J. Biol. Chem.* 2008. № 283. P. 29615–29619.
- 111) Ting J.T., Lee B.R., Chong P., Soler-Llavina G., Cobbs C., Koch C., Lein E. Preparation of Acute Brain Slices Using an Optimized N-Methyl-D-glucamine Protective Recovery Method // *J Vis Exp.* 2018. № 132. P. 53825. doi:10.3791/53825.
- 112) Urban L., Neill K.H., Crain B.J., Nadler J.V., Somjen G.G. Postischemic synaptic physiology in area CA1 of the gerbil hippocampus studied in vitro // *J Neurosci.* 1989. Vol. 9, № 11. P. 3966–3975. doi:10.1523/JNEUROSCI.09-11-03966.1989.

- 113) Wang M., Ramasamy V.S., Samidurai M., Jo J. Acute restraint stress reverses impaired LTP in the hippocampal CA1 region in mouse models of Alzheimer's disease // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, № 1. 10955. doi:10.1038/s41598-019-47452-6.
- 114) Winblad B., Graf A., Riviere ME., Andreasen N., Ryan J.M. Active immunotherapy options for Alzheimer's disease // *Alz Res Therapy*. 2014. Vol. 1, № 6. P. 7. doi: 10.1186/alzrt237.
- 115) Xiao N.A., Zhang J., Zhou M, Wei Z., Wu X.-L., Dai X.-M., Zhu Y-G., Chen X.-C. Reduction of Glucose Metabolism in Olfactory Bulb is an Earlier Alzheimer's Disease-related Biomarker in 5XFAD Mice // *Chin Med J (Engl)*. 2015. Vol. 128, № 16. P. 2220–2227. doi:10.4103/0366-6999.162507.
- 116) Xiong G., Metheny H., Johnson B.N., Cohen A.S. A Comparison of Different Slicing Planes in Preservation of Major Hippocampal Pathway Fibers in the Mouse // *Front Neuroanat*. 2017. Vol. 11. P. 1–17. doi:10.3389/fnana.2017.00107.
- 117) Zhang, X., Wu, F., Yang, N. et al. In silico Methods for Identification of Potential Therapeutic Targets. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* 14, 285–310 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12539-021-00491-y>.