

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2024 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии АННО ВО НИЦ «Санкт - Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Научный руководитель:

заслуженный деятель наук РФ,
профессор, доктор медицинских наук

Рыжак Галина Анатольевна

Официальные оппоненты:

Рыбникова Елена Александровна, доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель директора, заведующая лабораторией регуляции функций нейронов мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Колосова Наталия Гориславовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова Российской академии наук

Защита состоится «___» _____ 2025 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский проспект, д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12 и на сайте <https://iems-pb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «___» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Суфиева Дина Азатовна

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 СА1 области гиппокампа в возрасте 5 месяцев. С помощью полученной модели впервые оценена морфология дендритных шипиков нейронов СА1 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 СА1 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. *На втором этапе* изучали влияние коротких пептидов на формирование долговременной потенциации в гиппокампе мышей линии 5xFAD в возрасте 4 месяцев с помощью электрофизиологических методов регистрации полевых потенциалов в переживающих срезе гиппокампа. 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) мыши 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 и оценивали патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у животных данной линии в модели БА в возрасте 4 и 5 месяцев. 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 у мышей 5xFAD-M. 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 дикого типа линии M (контроль 1) с введением физиологического раствора (n=10; 5 самцов, 5 самок); 2) мыши линии 5xFAD-M с введением физиологического раствора (контроль 2, n=10;

5 самцов, 5 самок); 3) мыши линии 5xFAD-M с введением пептида EDR (n=10; 5 самцов, 5 самок); 4) мыши линии 5xFAD-M с введением пептида KED (n=10; 5 самцов, 5 самок).

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-самцам 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 молодежной 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 ассамблеи 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 28 научных работ, в том числе 5 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 108 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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. Безprozванный) Федерального государственного автономного образовательного

учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Базы данных. 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.: для пептида KE – TCGA (ICM-Score=-35,8), для пептида EDR – TTGC (ICM-Score=-52,5), для пептида KED – TTAGGG (ICM-Score=-31,7), AEDG – TTCCCGGC (ICM-Score=-33,3), где ICM-Score – оценка связывания. В связи с тем, что при докинге низкомолекулярных лигандов приемлемой для высокоэффективного связывания является величина ICM-Score ≤ -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 (транскрипционными факторами, малыми некодирующими РНК и др.).

Поиск промоторных последовательностей генов человека осуществляли в The Eukaryotic Promoter Database (EPD). Database URL: <http://www.epd.isb-sib.ch> [Périer 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» [Feldes B.C. et al., 2020]. Для оценки функционального обогащения белок-белковых взаимодействий (PPI) с помощью терминов генной 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.

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). Все манипуляции с животными соответствовали положениям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), а также принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с лабораторными животными (1996). Генотип животных определяли с помощью выделения геномной ДНК из кончика хвоста мыши, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ДНК-электрофореза.

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 (Na₂EDTA), 20 mM трис(гидроксиэтил)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.

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 MgCl₂, 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: *GCCATGAGGGC ACTAATCAT*, для трансгена *GFP* – F: *ACAGACACACCCAGGACA*, R: *CGGTGGT GCAGATGAACTT*, положительный контроль – F: *CTAGGCCACAGAATTGAAAG ATCT*, 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.

Электрофорез ДНК. В геле из 1% агарозы, приготовленном на основе трис-ацетатного буфера, проводили электрофорез ДНК с добавлением интеркалирующего красителя GelRed (Gel Red Nucleic Acid Gel Stain, Cat. #41002, Biotium) 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., соответствующая присутствию трансгена *GFP*.

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. При изменении цвета печени до темно-коричневого, осветлении хвоста и конечностей перфузию останавливали, мышью декапитировали, извлекали мозг и помещали в 4% фосфатно-солевой раствор параформальдегида (PFA/PBS), который

хранили в течение суток 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 вибратора, которая была заполнена охлажденным карбогенируемым раствором иСМЖ с NMDG (табл. 3).

Приготовление переживающих срезов гиппокампа. Для приготовления переживающих срезов проводили транскардиальную перфузию предварительно анестезированным животным с применением раствора иСМЖ с NMDG (№1) при температуре +4°С. Далее извлекали головной мозг и с помощью вибратора (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 иСМЖ №1* с NMDG: 92mM NMDG; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 30 mM NaHCO₃; 20 mM HEPES; 25 mM D-glucose; 2 mM Thiourea; 5 mM Na-ascorbate; 3 mM Na-pyruvate; 0,5 mM CaCl₂; 10 mM MgSO₄. *Раствор иСМЖ №2* (pH 7,3 – 7,4): 92 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 30 mM NaHCO₃; 20 mM HEPES; 25 mM D-glucose; 2 mM Thiourea; 5 mM Na-ascorbate; 3 mM Na-pyruvate; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgSO₄. *Раствор иСМЖ №3* (pH 7,3 – 7,4): 119 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 24 mM NaHCO₃; 5 mM HEPES; 12,5 mM D-glucose; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgSO₄.

Стимуляция и регистрация полевых потенциалов. Стимуляцию коллатералей Шаффера осуществляли в области stratum radiatum на границе полей CA2 и CA1 гиппокампа импульсами по 20 с длительностью 0,1 мс (0,033 Гц), увеличивая силу тока от 10 до 300 мкА с шагом 10 мкА. Силу тока подбирали при амплитуде пВПСП, соответствующей 40-50% от той [Tetteh H. et al., 2019], на которой впервые появлялся популяционный спайк, характеризующий постсинаптический популяционный потенциал. При отсутствии популяционного спайка выбирали ту силу тока, при которой амплитуда пВПСП была максимальна и стабильна [Mathis D.M. et al., 2011]. пВПСП регистрировали в течение 20 мин, что было принято за базовый ответ. Далее индуцировали ДВП с помощью протокола высокочастотной стимуляции 100 Гц.

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, USA) при помощи усилителя Multiclamp 700B (Molecular devices, USA) и цифрового преобразователя Digidata 1440A series (Molecular devices, USA). Усилителем управляли с помощью программы MultiClamp™ Commander.

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), что свидетельствует о скорости 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].

Приготовление фиксированных срезов мозга. Фиксированные срезы мозга изготавливали на вибротоме (Lancer Vibratome Series 1000 Sectioning System 054018, USA) толщиной 40 мкм в присутствии PBS, хранили срезы в 24-луночной планшете в растворе 0,5% забуференного PFA, заключали в среде Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc. Cat# 18606, США) для дальнейшего морфометрического анализа.

Морфометрический анализ. Для анализа получали серии микрофотографий-срезов при 100-кратном увеличении (Olympus UPlanSApo) с разрешением 1024×1024 при толщине среза 0,2 мкм/пиксель с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа ThorLabs. Толщина серии срезов в среднем составляла 4-8 мкм. От каждой мыши было получено 10 микрофотографий нейронов CA1 области гиппокампа. Для оценки распределения GFP в нейронах гиппокампа мышей линии 5xFAD-M 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 ImageJ 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.

Статистический анализ. Данные анализировали в программных обеспечениях Microsoft Excel, Clampfit, Statistica 12 и GraphPad Prism. Использовали критерий Крускала-Уоллиса, критерий Манна-Уитни, S-критерий тенденций Джонкхира, t-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим применением критерия Даннета в качестве апостериорного теста. Во всех исследованиях уровень значимости (α) принимали равным 0,05. При этом результаты считали достоверными, если вероятность (p) нарушения гипотезы об отсутствии различий между выборками была меньше уровня значимости α . В данном случае, при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Разработка подхода по прогнозированию биологических мишеней нейропротекторного действия коротких пептидов при болезни Альцгеймера у человека

Подход по прогнозированию биологических мишеней нейропротекторного действия коротких пептидов при БА у человека заключался в следующем. С помощью базы данных Pathcards было выявлено 369 генов, вовлеченных в развитие БА. 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. Белки, образующие кластеры менее чем из 4 элементов, не рассматривались с точки зрения функциональной взаимосвязи.

С помощью базы данных EPD, которая на момент написания работы насчитывает 29598 промоторов генов человека, нуклеотидная последовательность TTGC, по которой связывается пептид EDR с двунитевой ДНК *in silico*, была найдена в 2407 промоторах генов человека (из которых 17% ассоциированы с патогенезом БА), последовательность TCGA, по которой связывается пептид KE, – в 1283 промоторах генов человека (из которых 2% ассоциированы с патогенезом БА), последовательность TTCCCGGC, по которой связывается пептид AEDG, – в 104 промоторах генов человека (из которых 1% ассоциированы с патогенезом БА) (Таблица 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее перспективным пептидом, обладающим наибольшим количеством мишеней, вовлеченных в патогенез болезни Альцгеймера, является пептид EDR.

При функциональном анализе белковые продукты 82 целевых генов для пептида EDR были разделены на 9 кластеров, 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) (Рисунок 1). В скобках указаны гены, специфичные для пептида EDR.

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 и проведен в условиях *in*

silico, его результаты согласуются с большим объемом работ по исследованию биологических свойств пептида EDR в разных патологических процессах.

Таблица 1
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%)

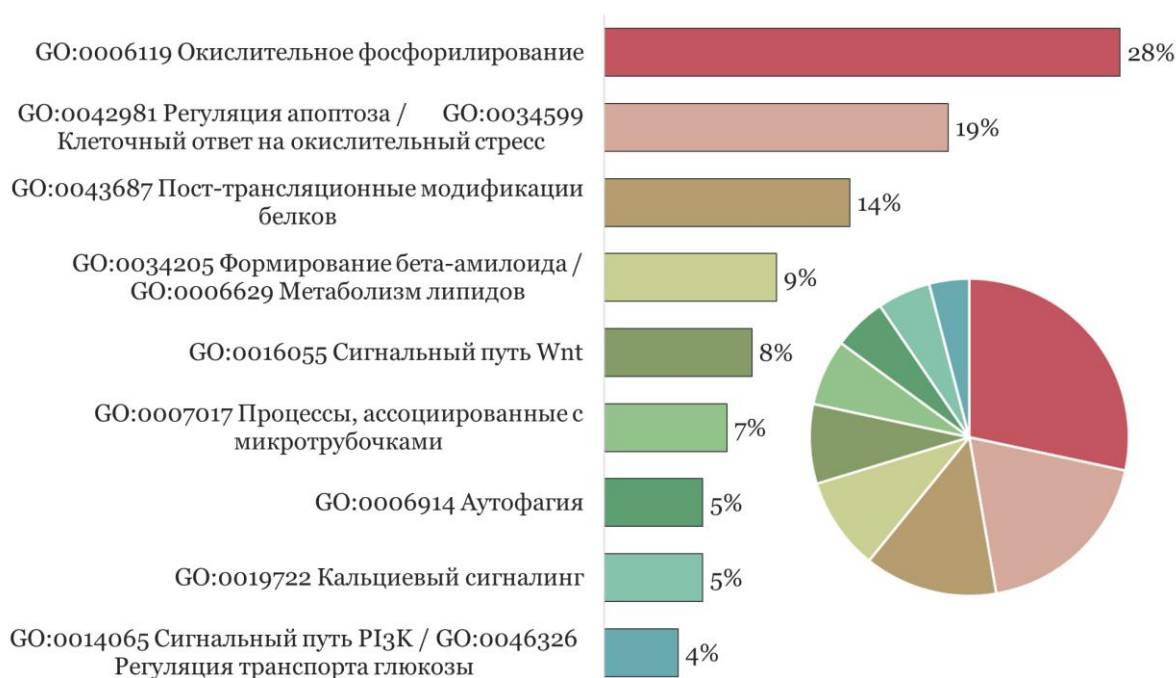


Рисунок 1 – Распределение белковых продуктов генов-мишеней для пептида EDR, образующих функциональные кластеры в зависимости от процесса, в который вовлечены. Диаграмма справа отражает долю каждого функционального кластера в общей сети взаимодействий.

II. Влияние коротких пептидов на синаптическую пластичность в мозге мышечной линии 5xFAD в модели болезни Альцгеймера

Синаптическую пластичность в мозге мышечной линии 5xFAD изучали методом регистрации пВПСП при высокочастотной стимуляции коллатералей Шаффера с целью индукции ДВП. При количественном анализе пластичности путем оценки угла наклона восходящей фазы пВПСП относительно базового значения были получены следующие результаты (Рисунок 2). В гиппокампе мышечной линии 5xFAD в возрасте 4 мес через 50 мин после высокочастотной стимуляции коллатералей Шаффера относительный угол наклона восходящей фазы пВПСП статистически значимо не отличался от данного показателя в контрольной группе (Kruskal–Wallis test, $p=0,057$).

Внутрибрюшинное введение пептидов EDR и KED мышам линии 5xFAD не приводило к статистически значимому изменению относительного угла наклона восходящей фазы пВПСП по сравнению с контрольной группой мышей линии 5xFAD, которым вводили физиологический раствор (Kruskal–Wallis test, $p=0,316$ и $p=0,057$, соответственно). При анализе результатов с помощью S-критерия тенденций Джонкира была выявлена выраженная тенденция возрастания относительного угла наклона восходящей фазы пВПСП при последовательном переходе от группы 5xFAD к группам EDR, WT и KED ($p<0,05$) (Рисунок 3).

Полученный результат указывает на наличие тенденции к снижению долговременной потенциации у мышей линии 5xFAD по сравнению с контролем дикого типа, что в свою очередь соответствует литературным данным о нарушении формирования ДВП и, как следствие, нарушении синаптической пластичности в гиппокампе мышей линии 5xFAD [Crouzin N. et al., 2013; Popugaeva E. et al., 2019; Wang M. et al., 2019].

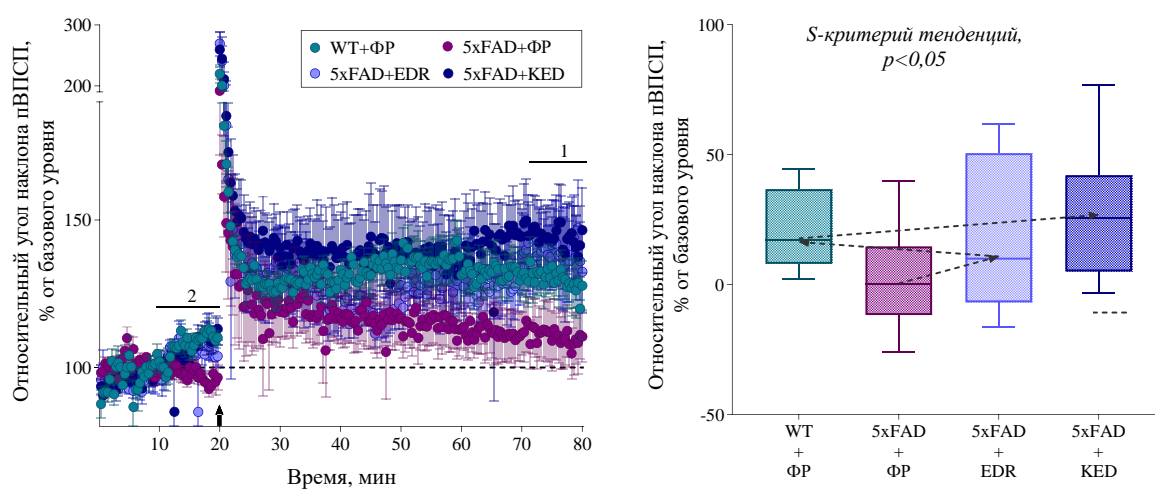


Рисунок 2 – Количественная оценка синаптической пластичности. Слева – изменения пВПСП, регистрируемого в stratum radiatum CA1 области гиппокампа мышей до и после индукции ДВП (момент высокочастотной стимуляции коллатералей Шаффера обозначен стрелочкой). Каждой точке на графике соответствует среднее значение 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. Справа – диаграмма размаха («box plot») показателя пластичности по группам. Стрелками указано направление изменения показателя в соответствии с S-критерием тенденций Джонкира.

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.

III. Характеристика модели прогрессирующей синаптической дегенерации 5xFAD-M при болезни Альцгеймера

Трансгенная линия 5xFAD-M была получена путем многоступенчатого кросс-бридинга мышей линии 5xFAD с мышами линии М. На фиксированных срезах мозга мышей линии 5xFAD-M и дикого типа был проведен анализ распределения GFP в нейронах CA1 области гиппокампа (Рисунок 3).

Отсутствие статистически значимых различий в интегративной плотности пикселей, соответствующих экспрессии GFP в дендритных шипиках пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M и линии М (Two-tailed Welch's t-test, $p=0,4752$), позволило корректно провести дальнейший морфологический анализ.

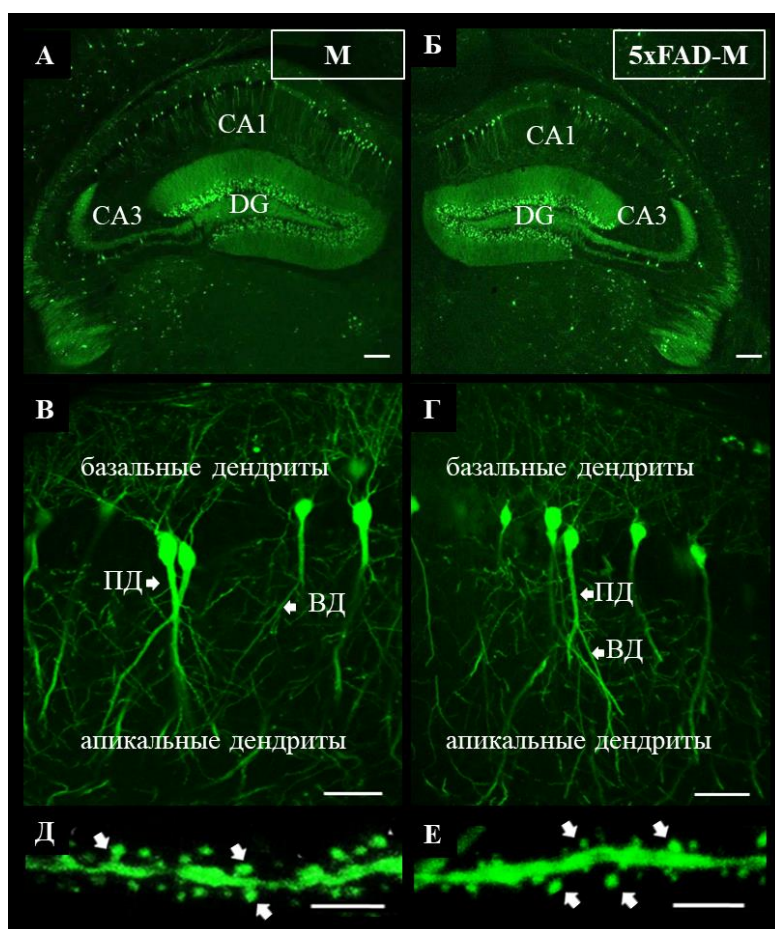


Рисунок 3 – Экспрессия зеленого флуоресцентного белка (GFP) в нейронах головного мозга мышей линии М (контроль) и 5xFAD-M. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. А, Б – CA1 и CA3 области гиппокампа, зубчатая извилина (DG); В, Г – базальные и апикальные дендриты пирамидных нейронов CA1 области 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). Сокращения: ПД – первичный дендрит, ВД – вторичный дендрит.

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

Результаты анализа возрастных патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M в модели БА представлены в таблице 2. 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 М

[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: $U(65, 71) = 29$, $p=0.798$].

Доля дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита в CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев достоверно снижалась 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 M и 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев выявлено не было [Mann–Whitney U test: $U(860, 625) = 299$, $p=0.405$].

Таблица 2

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

Возраст	Параметр	Линия M (контроль)	Линия 5xFAD-M
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.

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.

Патоморфологические изменения дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M разного пола

Доля дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита в CA1 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-М в возрасте 5 месяцев выявлено не было [Mann–Whitney U test: $U(860, 625) = 299, p=0.405$] (Таблица 3).

Доля шипиков на 10 мкм длины дендрита на нейронах CA1 области гиппокампа у самок мышей линии 5xFAD-М 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-М 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-М 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-М в возрасте 5 месяцев выявлено не было [Mann–Whitney U test: $U(778, 933) = 372, p=0.530$] (Таблица 3).

Таблица 3

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.

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

У мышей линии 5xFAD-М в возрасте 5 мес, которых подвергали курсовому введению пептида EDR, выявлено увеличение доли дендритных шипиков на 10 мкм длины дендрита на нейронах в CA1 области гиппокампа на 11% по сравнению с контролем 2 [$p=0.039$]. Относительное количество дендритных шипиков грибовидного типа у мышей линии 5xFAD-М, которым вводили пептид EDR, достоверно не отличалось от этого показателя у мышей линии 5xFAD-М с введением физиологического раствора [$p=0.053$]. Относительное количество дендритных шипиков тонкого типа у мышей линии 5xFAD-М, 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 4).

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

Параметр	М + 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. *, ** – $p < 0.05$, $p < 0.01$ 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 CA1 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 [$p = 0.162$] (Таблица 4).

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.

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 5. 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 [$p = 0.019$]. Наблюдалось увеличение относительного количества дендритных шипиков грибовидного типа у мышей линии 5xFAD-M, 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-M,

которым вводили пептид EDR и физиологический раствор, выявлено не было [TS: $p = 0.123$; SS: $p = 0.998$].

У мышей-самцов линии 5xFAD-M в возрасте 5 мес, которым вводили трипептид KED в курсовом режиме, наблюдалось достоверное увеличение плотности дендритных шипиков нейронов CA1 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: $p = 0.448$].

Таблица 5

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
DSD, шипиков/10 МКМ	12.52±0.38	10.62±0.49**	12.21 ± 0.40*	13.56 ± 0.27***
MS, %	45.06±1.64	30.22±2.78**	40.23 ± 1.52*	41.13 ± 1.48*
TS, %	39.07±1.78	48.21±4.20*	42.01 ± 1.96	43.61 ± 1.46
SS, %	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.

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.

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 6. 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.

Морфологические параметры дендритных шипиков нейронов гиппокампа у самок 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	13.39±0.53	11.74±0.49*	13.31 ± 0.51*	11.24 ± 0.33
MS, %	43.94±1.44	35.60±1.62***	36.35 ± 1.43	39.66 ± 2.09
TS, %	42.65±1.69	51.38±1.76***	48.45 ± 1.86	44.18 ± 2.99*
SS, %	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.

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

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. 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.

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 СА1 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 СА1 области гиппокампа у мышей трансгенной линии 5xFAD-M, которые считаются функционально активными постсинаптическими структурами.

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 СА1 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 СА1 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

КЕД 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 КЕД самкам мышей линии 5xFAD-M способствует снижению дендритных шипиков тонкого типа на 14% в возрасте 5 мес по сравнению с соответствующим контролем.

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 КЕД рекомендованы для дальнейшего изучения в качестве активных соединений для разработки терапевтического средства для профилактики и лечения болезни Альцгеймера.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. Перспективы применения коротких пептидов при фармакотерапевтической коррекции болезни Альцгеймера / **А.Р. Ильина**, И.Г. Попович, Г.А. Рыжак, В.Х. Хавинсон // Успехи геронтологии. – 2024. – Т.37, №1-2. – С. 10-21.
(Англ. версия: **A.R. Iilina**, I.G. Popovich, G.A. Ryzhak, V.Kh. Khavinson / *Prospects for use of short peptides in pharmacotherapeutic correction of Alzheimer's disease // Advances in Gerontology*. – 2024. – Vol.37, № 1-2. – P. 10-21.)
2. A Transgenic 5xFAD-M Line of Mice for Dendritic Spine Morphology Analysis in Alzheimer's Disease / **A. Iilina**, N. Linkova // *Brain Sciences*. – 2023. – Vol. 13, № 2. 307. doi: 10.3390/brainsci13020307.
3. Neuroepigenetic Mechanisms of Action of Ultrashort Peptides in Alzheimer's Disease / **A. Iilina**, V. Khavinson, N. Linkova, M. Petukhov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 4259. doi: 10.3390/ijms23084259
4. Neuroprotective Effects of Tripeptides-Epigenetic Regulators in Mouse Model of Alzheimer's Disease / V. Khavinson, **A. Iilina**, N. Kraskovskaya, N. Linkova, N. Kolchina, E. Mironova, A. Erofeev, M. Petukhov // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14, № 515. doi: 10.3390/ph14060515
5. Peptide Regulation of Gene Expression: A Systematic Review / V.K. Khavinson, I.G. Popovich, N.S. Linkova, E.S. Mironova, **A.R. Iilina** // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 7053. doi: 10.3390/molecules26227053

Главы в монографиях

6. Глава 1. Пептид EDR – регулятор экспрессии сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга. Соавторы: И.М. Кветной, В.О. Полякова, Е.С. Миронова, **А.Р. Ильина**, А.Н. Богатырев – С. 14-28. В книге В.Х. Хавинсон, Р.С. Умнов, Н.С. Линькова, А.В. Арутюнян «Молекулярно-клеточные механизмы пептидергической регуляции функций мозга». – М.: Наука, 2018. – 222 с.
7. Глава 3. Биофизические аспекты взаимодействия пептида EDR с ДНК и гистоновыми белками. Соавторы: С.И. Тарновская, **А.Р. Ильина**, А.В. Дудков – С. 52-93. В книге В.Х. Хавинсон, Р.С. Умнов, Н.С. Линькова, А.В. Арутюнян «Молекулярно-клеточные механизмы пептидергической регуляции функций мозга». – М.: Наука, 2018. – 222 с.
8. Роль пептидов в развитии морфофункциональных характеристик нейронных сетей в модели болезни Альцгеймера *in vivo*. Соавторы: **А.Р. Ильина**, Н.А. Красковская – С. 72-78. В книге И.Г. Попович, Г.А. Рыжак, М.Г. Петухов, Н.С. Линькова, Е.О. Кожевникова, Е.С. Миронова, Н.А. Красковская, **А.Р. Ильина**, Н.В. Борушко (Колчина) «Пептиды и геном: молекулярные механизмы нейропротекции: монография» / по ред. В.Х. Хавинсона, А.И. Рудского. – СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2022. – 97 с.

Тезисы докладов

9. Роль ультракоротких пептидов для фармакотерапевтической коррекции болезни Альцгеймера / **А.Р. Ильина**, И.Г. Попович // III Санкт-Петербургский геронтологический форум «Развитие Российской геронтологии и приоритеты государственной политики в сфере медико-социальной поддержки граждан старшего поколения». – г. СПб. / В журнале: Успехи геронтологии. – 2023. – Т. 36, № 3. – С. 418.
10. Влияние коротких пептидов мозга и сосудов на морфофункциональное состояние нейронных сетей у мышей в модели болезни Альцгеймера *in vivo* / **А.Р. Ильина** // Материалы XXVIII всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022». – г. СПб. – 2022. – С. 71-72.
11. Системная регуляция нейродегенеративных процессов при болезни Альцгеймера с помощью коротких пептидов / **А.Р. Ильина** // VI междисциплинарная конференция с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», посвященная 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова. – г. Москва. – 2022. – С. 222-223.
12. Нейропротекторное действие коротких пептидов в модели болезни Альцгеймера у мышей / **А.Р. Ильина** // Материалы VIII молодежной школы-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН. – г. СПб. / В журнале: Цитология. – 2022. – Т. 64, № 7. – С. 706.
13. Перспектива применения коротких пептидов при фармакотерапии болезни Альцгеймера / **А.Р. Ильина** // XV Международный форум «Старшее Поколение». – г. СПб. – 2022. – С. 598-599.
14. Влияние коротких пептидов на морфофункциональное состояние нейронных сетей гиппокампа в модели болезни Альцгеймера / **А.Р. Ильина** // Двадцать пятая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов: Сборник тезисов – СПб.: Изд-во СПбГУТД. – 2022. – С. 47.

15. Нейропротекторные эффекты трипептидов в модели болезни Альцгеймера у мышей / **А.Р. Ильина**, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова, Р.С. Умнов, В.Х. Хавинсон // X Российский симпозиум «Белки и пептиды». – г. Сочи. – 2021. – С. 76-77.
16. Влияние ультракоротких пептидов на морфологию синаптических контактов в модели болезни Альцгеймера / **А.Р. Ильина**, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова, Р.С. Умнов, В.Х. Хавинсон // XXIII конгресс с международным участием «Давыденковские чтения. Неврология». – г. СПб. – 2021. – С. 103-104.
17. Анализ патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа в мышинной модели болезни Альцгеймера 5xFAD-M / **А.Р. Ильина**, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова // Тезисы VII молодёжной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. – г. СПб. / В научно-практическом журнале: Гены и клетки. – 2020. – Т. XV, №3. – С. 163.
18. Создание трансгенной линии мышей 5xFAD-M для анализа патоморфологических изменений нейронов гиппокампа при болезни Альцгеймера / **А.Р. Ильина**, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова // Тезисы XXI Зимней молодежной школы-конференции по биофизике и молекулярной биологии. – г. Гатчина. – 2020. – С.91-92.
19. Влияние пептида KED на количество грибовидных шипиков нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера у мышей линии 5xFAD-M / **А.Р. Ильина**, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон // Сборник тезисов международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине» Научно-исследовательского института медицинской приматологии. – г. Сочи. – 2020. – С. 52-53.
20. Влияние пептида KED на нейропластичность в модели болезни Альцгеймера у мышей линии 5xFAD / **А.Р. Ильина**, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова, А.И. Ерофеев, В.Х. Хавинсон // Сборник трудов XXIV научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – г. Москва. – 2020. – С. 63-65.
21. Нейропротекторный пептид EDR: от механизмов действия к перспективам практического применения / Н.С. Линькова, **А.Р. Ильина**, Р.С. Умнов, В.Х. Хавинсон // Тезисы Первой учредительной конференции Международной Нейробиопсихиатрической Ассоциации «Современная психиатрия». – 2019. – С. 44-48.
22. Экспрессия пептида аβ42 в буккальном эпителии у лиц разного возраста с болезнью Альцгеймера / **А.Р. Ильина**, В.А. Зуев, Н.С. Линькова // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт биомедицинских систем и технологий. – г. СПб. – 2018. – С. 88-91.
23. Экспрессия белков p16 и p53 в буккальном эпителии: оценка темпа старения организма при развитии болезни Альцгеймера / В.А. Зуев, **А.Р. Ильина**, Т.В. Кветная // Специалист здравоохранения. – 2018. – Т.18., № 4. – С. 4-5.
24. The EDR and KED peptides improve the morphofunctional state of neuronal networks in mouse model of Alzheimer's disease / **A.R. Iina** // IIIrd International Mini-Conference «Antimicrobial peptides as prototypes of novel antibiotics» World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Institute of Experimental Medicine. – Saint Petersburg. – 2023. – P. 28.

25. Prospects for use of short peptides as systemic regulators of neurodegenerative processes in Alzheimer's disease / **A.R. Iina** // IInd International Seminar «Antimicrobial peptides as prototypes of novel antibiotics» World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Institute of Experimental Medicine. – Saint Petersburg. – 2022. – P. 40.
26. KED peptide prevents synaptic contacts elimination of hippocampus neurons in an in vivo Alzheimer's disease model / **A. Iina**, N. Kraskovskaya, N. Linkova, V. Khavinson // Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks. – Moscow. – 2021. – P. 23-24.
27. Age-related pathomorphological changes of neurons in 5xFAD-M mouse model of Alzheimer's disease / **A.R. Iina**, N.A. Kraskovskaya, N.S. Lin'kova, V.Kh. Khavinson // International Conference on Biotechnology and Health 2020. Russian-Armenian University. – Yerevan, Armenia. – 2020. – P. 80-81.
28. EDR peptide: perspectives of applying in neuroprotection / V. Khavinson, N. Linkova, E. Kozhevnikova, N. Kraskovskaya, **A. Iina** // Regenerative medicine and ageing. Book of abstract. – Dubai. – 2020. – P. 25-26.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БА	–	болезнь Альцгеймера
ДВП	–	долговременная потенция
иСМЖ	–	искусственная спинномозговая жидкость
пВПСП	–	полевой возбуждающий постсинаптический потенциал
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
ФР	–	физиологический раствор
5xFAD	–	B6SJL-Tg (APP ^{SwFLon} , PSEN1 ^{*M146L*L286V})
СА	–	cornu ammonis
DSD	–	плотность дендритных шипиков
EDR	–	Glu – Asp – Arg
KED	–	Lys – Glu – Asp
MCL	–	кластерный алгоритм Маркова
MS	–	количество грибовидных шипиков
PBS	–	фосфатно-солевой буфер
PFA	–	параформальдегид
SS	–	количество пеньковых шипиков
TAE	–	Tris-acetate-EDTA
TS	–	количество тонких шипиков
WT	–	дикий тип

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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; Albensi 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; [Электронный ресурс] URL: <http://pathcards.genecards.org/> (дата обращения: 15.04.2020); [Электронный ресурс] URL: <http://www.epd.isb-sib.ch>. (дата обращения: 15.04.2020); [Электронный ресурс] Database URL: <https://string-db.org/> (дата

обращения: 15.04.2020); 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; 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; 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; 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; 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; Lynch C. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia, a global surge // *Alzheimer's Dement.* 2020. Vol. 16, № 10. e038255; 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; 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; 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; 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; 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; 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: 10.1101/601492 96; Ramsay R.R., Popovic-Nikolic 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; 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; 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; 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. doi:10.3791/59879; 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.