

*На правах рукописи*

**КОЖЕВНИКОВА**

**Екатерина Олеговна**

**КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ  
ТРИПЕПТИДОВ В МОДЕЛЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ *IN VITRO***

**14.01.30 – геронтология и гериатрия**

**03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Санкт-Петербург – 2018**

Работа выполнена в лаборатории молекулярной нейродегенерации ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и лаборатории молекулярных механизмов старения АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

**Научные руководители:**

заслуженный деятель науки РФ,  
член-корреспондент РАН,  
профессор, доктор медицинских наук  
**Хавинсон Владимир Хацкелевич**

доктор биологических наук, доцент  
**Линькова Наталья Сергеевна**

**Официальные оппоненты:**

**Ванюшин Борис Федорович**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, руководитель отдела молекулярных основ онтогенеза;

**Крылов Борис Владимирович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН», лаборатория физиологии возбудимых мембран, заведующий лабораторией.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет»

Защита диссертации состоится «25» декабря 2018 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 521.103.01 в АННО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: *197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.*

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АННО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан «    »                      2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета Д 521.103.01,  
доктор биологических наук, профессор



Евдмила Семеновна Козина

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность работы**

Нейродегенеративные заболевания представляют собой гетерогенную группу заболеваний нервной системы, которые характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов мозга. Наиболее распространенными и тяжелыми заболеваниями этой группы являются болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона [Dauphinot V. et al., 2013]. Указанные нейродегенеративные заболевания наиболее характерны для лиц пожилого и старческого возраста, поэтому изучение механизмов патогенеза болезней Альцгеймера и Хантингтона и поиск возможных веществ, эффективных в их лечении, представляет особый интерес и для геронтологии.

Болезнь Альцгеймера – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, наиболее распространенная форма деменции. Основные признаки болезни Альцгеймера - прогрессирующее расстройство памяти, формирование сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков в головном мозге [Small S.A. et al., 2008], активация микроглии [Hardy J. et al., 2009]. При болезни Альцгеймера в первую очередь наблюдается дегенерация нейронов гиппокампа. Болезнь Хантингтона – аутосомно-доминантное наследственное нейродегенеративное заболевание, при котором происходит образование мутантного белка хантингтина, который агрегирует и нарушает функции нейронов. На ранних стадиях болезни Хантингтона поражаются преимущественно ГАМК-ергические средние шипиковые нейроны стриатума [Harper P. et al., 2002].

Связь нейронов происходит через синаптическую передачу, поэтому нормальное формирование синаптических контактов на дендритном дереве – важный компонент для правильного функционирования нейронных сетей. При болезни Альцгеймера и Хантингтона происходит нарушение формирования синапсов или потеря их стабильности, что приводит к разрушению межнейронных связей [Kulkarni V.A. et al., 2012].

В настоящее время перспективными нейропротекторами являются короткие пептиды, обладающие высокой физиологической активностью и низкой иммуногенностью [Anisimov V.N. et al., 2010; Мясоедов Н.Ф. и др., 2010]. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии были разработаны пептиды EDR (Пинеалон, Glu-Asp-Arg, T-33) и KED (Везуген, Lys- Glu-Asp, T-38), обладающие нейропротекторным и ангиопротекторным свойствами, соответственно [Хавинсон В.Х. и др., 2014]. Пептиды KED и EDR снижают апоптоз и способствуют улучшению функций памяти, внимания, мышления, ускорению перцептивно-моторных реакций, повышению умственной работоспособности, уменьшению степени постарения центральной нервной системы у лиц старших возрастных групп. Однако влияние этих пептидов на морфологию нейронов и межнейронные взаимодействия при болезни Альцгеймера и болезни Хантингтона до сих пор не было изучено.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы - изучить влияние пептидов EDR и KED на морфологию и взаимодействие нейронов в культурах в моделях болезни Хантингтона и болезни Альцгеймера. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить элиминацию синаптических контактов нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре трансгенных мышей с мутантным геном хантингтина человека (модель болезни Хантингтона) при ее старении *in vitro*.
2. Оценить влияние пептидов EDR и KED на формирование шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов (модель болезни Хантингтона) при ее старении.
3. Оценить влияние пептидов EDR и KED на количество шипиков в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера).
4. Изучить влияние пептидов EDR и KED на количество шипиков в культуре нейронов гиппокампа у мышей линии PS1-M146V-KI (модель болезни Альцгеймера с мутантным геном белка пресенилина-1).
5. Среди двух изученных моделей болезни Альцгеймера выбрать наиболее перспективную для изучения нейропротекторных свойств пептидов.
6. Сравнить эффективность пептидов EDR и KED в моделях болезней Хантингтона и Альцгеймера *in vitro*.

### **Научная новизна**

В работе впервые была изучена способность пептидов EDR и KED восстанавливать синаптические контакты между нейронами в моделях болезни Альцгеймера и болезни Хантингтона *in vitro*. Впервые установлено, что пептид EDR увеличивает количество грибовидных шипиков в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера) в концентрации 20 нг/мл - на 35% и в концентрации 200 нг/мл - на 71% по сравнению с контрольной группой при добавлении олигопептидов A $\beta$ 42 (создание амилоидной синаптотоксичности). Впервые показано, что в кортико-стриатной культуре нейронов (модель болезни Хантингтона) при ее старении пептид EDR увеличивает количество шипиков в нейронах стриатума на 35% в концентрации 200 нг/мл, а в концентрации 20 нг/мл не влияет на количество шипиков. Пептид KED вызывает увеличение количества грибовидных шипиков на 20% в концентрации 200 нг/мл в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера). Впервые показано, что наиболее перспективной для изучения нейропротекторных свойств пептидов EDR и KED является культура нейронов гиппокампа мышей дикого типа линии C57BL/6 (B6).

### **Практическая значимость**

Исследование влияния пептидов EDR и KED на формирование шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов (модель болезни Хантингтона) и нейронов гиппокампа в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера) позволило установить, что пептид EDR способствует нормализации функциональной активности нейронов, в моделях болезней Хантингтона и Альцгеймера. Практическая значимость работы состоит в том, что позволяет признать актуальным исследование пептида EDR в качестве потенциального нейропротекторного препарата нового поколения, эффективно восстанавливающего синаптические связи между нейронами.

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

1. Пептид EDR повышает количество шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов, полученной от мышей с болезнью Хантингтона (линия YAC128) при ее старении. Пептид KED не оказывает нейропротекторного действия на формирование шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов в модели болезни Хантингтона.
2. Пептид EDR стимулирует восстановление синаптической передачи, повышая количество грибовидных шипиков в культурах нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера (мышь дикого типа линии C57BL/6 в условиях амилоидной синаптотоксичности). Пептид KED влияет на восстановление грибовидных шипиков в культурах нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера только в большей из 2х изученных концентраций.
3. Исследование влияния пептидов EDR и KED в культуре нейронов гиппокампа у мышей линии PS1-M146V-KI (модель болезни Альцгеймера с мутантным геном белка пресенилин-1) не дает репрезентативных результатов.
4. Пептид EDR обладает более выраженным нейропротекторным эффектом и способностью восстанавливать синаптическую передачу у нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов (модель болезни Хантингтона) и гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера) по сравнению с пептидом KED.

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

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

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований, 3 главы в монографиях, 1 статья в другом журнале и 12 тезисов докладов.

### **Апробация и реализация диссертации**

Основные материалы диссертации доложены на научно-практической конференции с международным участием «Неделя Науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2015); научном форуме с международным участием «Неделя Науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2016); Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2016); V European congress of preventive, regenerative and anti-ageing medicine (Saint-Petersburg, 2016); VI Международном симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2017); International Symposium. Experts' opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology (Geneva, Switzerland, 2017); Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017); пептиды» (Москва, 2017); Научно-практическая конференция «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии 2017», посвященная 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии (Санкт-Петербург, 2017).

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в разработке плана исследования, проведении опытов, статистической обработке и анализе полученных данных. В задачи автора входило изучение влияния пептидов EDR и KED на формирование шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов (модель болезни Хантингтона), на формирование шипиков нейронов гиппокампа в культуре нейронов гиппокампа у мышей линии PS1-M146V-KI с мутантным геном белка пресенилина-1 и в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 и (модели болезни Альцгеймера). Автор принимала участие во всех экспериментах, включавших в себя культивирование клеток, иммуноцитохимическое окрашивание, микроскопию, морфометрию, генотипирование, кальций-фосфатную трансфекцию, в анализе полученных данных, статистической обработке полученных результатов исследования, написании статей, главы в монографии, тезисов, выступлениях с докладами на конференциях.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 122 страницах, содержит 1 таблицу, иллюстрирован 19 рисунками. Список литературы содержит 203 источника, из них на русском языке – 40, на английском – 163.

### **Благодарность**

Автор выражает благодарность за возможность проведения экспериментов в и помощь в освоении методик заведующему лабораторией молекулярной нейродегенерации ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» доктору биологических наук И.Б. Безпрозванному, заведующей кафедры «Медицинская физика» ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» доктору физико-математических наук, доценту О.Л. Власовой, научным сотрудникам лаборатории молекулярной нейродегенерации кандидату биологических наук Е.А. Попугаевой и кандидату биологических наук А.В. Большаковой, аспиранту кафедры «Медицинская физика» Н.А. Красковской.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### ***Характеристика исследуемого материала***

Объектом морфофункционального исследования для изучения нейропротекторного действия пептидов EDR и KED при болезни Хантингтона явились первичные диссоциированные кортико-стриатные культуры нейронов, полученные из головного мозга мышей дикого типа и трансгенных мышей с геном мутантного хантингтина человека FVB-Tg (YAC128)53Нау/J (линия YAC128) [Slow E.J., et al, 2003]. Для исследования влияния пептидов в модели болезни Альцгеймера были выбраны первичные диссоциированные культуры нейронов гиппокампа мышей дикого типа линии C57BL/6 (B6) и мышей линии PS1-M146V-KI с мутацией M146V в гене, кодирующем белок пресенилин-1. Данные модели были выбраны, так как ранее в них были успешно изучены другие

нейропротекторные вещества. На мышах линии YAC128 были изучены вещества Дантролен [Chen X., et al, 2011] и Тетрабеназин [Wang H., et al, 2010]. Были получены значительные улучшения в поведенческих тестах у мышей, а также значительное уменьшение потери стриатальных нейронов и образования ядерных агрегатов мутантного хантингина. А в трансгенной мышинной модели болезни Альцгеймера 3xTg-AD, содержащей мутации в генах пресенилина-1, белка-предшественника бета-амилоида (APP) и  $\tau$ -протеина, такое вещество, как Вогонин способствовало уменьшению количества амилоидных бляшек в коре и гиппокампе, а также улучшению реакции в поведенческих тестах (распознавание новых объектов и лабиринт) [Huang D.S., et al., 2017]. Все животные были получены из вивария Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME USA). Животных содержали в условиях вивария в Лаборатории молекулярной нейродегенерации ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого» при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормативами по гуманному обращению с лабораторными животными.

Кортико-стриатные культуры нейронов мышей дикого типа и трансгенных мышей линии YAC128 были разделены на группы: 1 - контроль (добавление среды для культивирования Neurobasal-A), 2 – добавление пептида EDR в концентрации 20 нг/мл, 3 - добавление пептида EDR в концентрации 200 нг/мл, 4 - добавление пептида KED в концентрации 20 нг/мл, 5 - добавление пептида KED в концентрации 200 нг/мл. Культуру нейронов гиппокампа разделяли на следующие группы: 1- контроль (добавление среды для культивирования Neurobasal-A), 2 - добавление синтетических олигонуклеотидов A $\beta$ 42 в контроль, 3а - добавление A $\beta$ 42 и пептида EDR в концентрации 20 нг/мл, 3б - добавление A $\beta$ 42 и пептида EDR в концентрации 200 нг/мл, 4а - добавление A $\beta$ 42 и пептида KED в концентрации 20 нг/мл, 4б - добавление A $\beta$ 42 и пептида KED в концентрации 200 нг/мл. Пептиды добавляли в культуры клеток за 1 сут до фиксации для морфофункционального анализа. Концентрации пептидов для диссоциированных культур нейронов были выбраны на основании результатов ранее проведенных исследований [Khavinson V.Kh. et al., 2012; 2014].

### ***Метод генотипирования мышей***

Так как скрещивание двух мышей линии YAC128 ведет к летальному исходу их потомства, гетерозиготных самцов линии YAC128 скрещивали с самками дикого типа. Для определения генотипа их потомства (дикий тип или YAC128) был использован метод генотипирования, который включал в себя постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофорез продуктов ПЦР. ДНК выделяли из кончиков хвостов новорожденных мышат (0-1 сут после рождения). Для растворения нарезанные хвосты помещали в раствор, содержащий SNET-буфер и протеиназу К в концентрации 10 мг/мл и помещали в термостат на 45 мин. Для проведения ПЦР готовили раствор ПЦР MIX, в который входили 2 праймера к экзонам 44 и 45 гена хантингина человека - RP – HD45 (5'-GCT CTG AAG GTA TTC CTG GAT-3') и FP – HD44 (5'-TGT GCT CAC GCT GTA TGT GGA-3'), буфер в десятикратном разведении 10мМ dNTP, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, воду, полимеразный буфер, ДНК. Затем продукты ПЦР выявляли после проведения агарозного электрофореза, выявляя трансгенных мышей: одна полоса – дикий тип, две полосы – мыши линии YAC128.

### ***Метод получения кортико-стриатной культуры нейронов***

Материалом для выделения первичных культур служили кора и стриатум, полученные от мышей дикого типа и трансгенных мышей YAC128 в возрасте 0-1 сут после рождения. Выделенные фрагменты головного мозга помещали в раствор, содержащий раствор Хенкса, 16 mM 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, антибиотики пенициллин и стрептомицин, автоклавированную бидистиллированную воду до объема 1 л, pH 7,2. Затем материал инкубировали с папаином (37°C, 30 мин) и диссоциировали в растворе (10% фетальная бычья сыворотка, 0,5 мг/мл ДНКазы). Клетки культивировали в 24-луночном планшете на 12 мм стеклах, покрытых поли-D-лизинем (Sigma) в среде Neurobasal (Invitrogen) с добавлением 2% B-27 (Gibco), 1% фетальной бычьей сыворотки и 1 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen). Культуры инкубировали при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. На 21 сут культивирования производили фиксацию клеток для морфофункционального анализа.

### ***Иммуноцитохимическое исследование кортико-стриатной культуры нейронов***

Для визуализации шипиков и дальнейшего морфофункционального анализа проводили иммуноцитохимическое окрашивание кортико-стриатной культуры нейронов на 14 и 21 сут культивирования. На 14 сут культивирования нейроны достигают состояния, соответствующего нейронам в мозге взрослого человека, а на 21 сут нейроны считаются «старыми»: в них наблюдаются клеточные процессы, характерные для мозга пожилых людей – дисфункция сигнальных путей, снижение экспрессии киназ и фосфатаз, участвующих в фосфорилировании белков, сдвиги кальциевого гомеостаза вплоть до формирования кальцификатов в мозговой ткани и другие процессы, которые, в конечном счете, приводят к нарушению нормального функционирования нейронов. Кроме того, при старении в нейронах мышей линии YAC128 накапливается мутантный хантингтин и его агрегаты [Gutekunst C.A., et al., 1999; Slow E.J. et al., 2003], вследствие чего нарушается функционирование нормального белка хантингтина, который выполняет широкий спектр биологических функций - скрепление белков, транспорт белков и везикул, защиту клеток от апоптоза, заякоривание цитоскелета, клатрин-опосредованный эндоцитоз, регуляцию транскрипции, постсинаптический сигналинг [Imarisio et al., 2008]. В работе использовали первичные антитела к маркеру средних шипиковых нейронов стриатума anti-DARPP-32 Rabbit (1:500, Sigma), к нейрональному маркеру anti-MAP2 Mouse (1:1000, Millipore) и вторичные антитела (1:1000), конъюгированные с флуорофорами (AlexaFluor 488 anti-rabbit и AlexaFluor 594 anti-mouse, Invitrogen). Фиксацию клеток проводили с использованием раствора 4% параформальдегида (PFA) + 4 % сахарозы в фосфатно-солевом буфере (PBS) на лунку в течение 20 мин при температуре +4°C (pH 7.2), пермеабелизацию – с помощью 0,1% Triton-X-100 (Helicon) в PBS в течение 5 мин при комнатной температуре. Для блокировки неспецифического связывания клетки в течение часа инкубировали в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma) в PBS при комнатной температуре. После инкубации культур с первичными антителами, разведёнными на блокирующем растворе, в течение ночи при температуре +4°C, клетки инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами, разведенными в PBS, при комнатной температуре в темноте. Отмытые в PBS стёкла с окрашенными нейрональными культурами монтировали на предметном стекле с помощью среды для заключения Mounting media (Polysciense).



### ***Метод получения культуры нейронов гиппокампа***

Для приготовления первичной диссоциированной культуры нейронов гиппокампа мышей дикого типа (линия В6) использовали новорожденных мышат (0-2 сут после рождения). Выделенные фрагменты головного мозга помещали в раствор, содержащий раствор Хенкса, 16 mM 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, антибиотики пенициллин и стрептомицин, автоклавированную бидистиллированную воду до объема 1 л, pH 7,2. Затем материал инкубировали с папаином (37°C, 30 мин), диссоциировали в растворе (10% фетальная бычья сыворотка, 0,5 мг/мл ДНКазы). Клетки культивировали в 24-луночной планшете на 12 мм стеклах, покрытых поли-D-лизинем (Sigma) в среде Neurobasal (Invitrogen) с добавлением 2% B-27 (Gibco), 1% фетальной бычьей сыворотки и 1 ммоль/л L-глутамина (Invitrogen). Культуры инкубировали при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. На 12 сут культивирования в исследуемые лунки планшета с культурами нейронов гиппокампа добавляли синтетические олигонуклеотиды Aβ42 до конечной концентрации 0,1 мкМ. На 16-17 сут культивирования проводили фиксацию клеток для морфофункционального анализа.

### ***Приготовление синтетических олигомерных пептидов Aβ42 для добавления в культуру нейронов гиппокампа***

Лиофилизированные пептиды Aβ42 (AnaSpec Inc) в объеме 1 мг растворяли в 80 мкл 1% раствора NH<sub>4</sub>OH и затем в 920 мкл стерильного фосфатного буфера (137мМ NaCl, 2мМ KCl, 10мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Полученный стоковый раствор с концентрацией 1 мг/мл хранили при температуре -20°C в аликвотах по 100 мкл. Перед применением стоковый раствор разводили Neurobasal (Invitrogen) средой до концентрации 1 мкМ в объеме 100 мкл и инкубировали при температуре +4°C в течение 24 ч. Затем раствор центрифугировали, чтобы отделить фракцию олигомеров от фибрилл. Далее в работе использовали полученную надосадочную жидкость.

### ***Кальций-фосфатная трансфекция нейронов гиппокампа***

Для визуализации морфологии нейронов культуру клеток гиппокампа трансфецировали плазмидой pCSGFP2:td-tomato (Addgene), кодирующей красный флуоресцентный белок, либо плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок pLV-eGFP (Addgene) [Veronja S. et al., 2010] методом кальций - фосфатной трансфекции на 7 сут культивирования при помощи набора Clontech Laboratories Inc. по протоколу производителя с некоторыми рекомендациями, согласно статье [Jiang M. et al., 2006]. Для кальций-фосфатной трансфекции использовали раствор А – 1 мкг плазмидной ДНК, 0,25 М CaCl<sub>2</sub>, стерильная вода и раствор В – 2-х кратный буферный солевой раствор, состоящий из 280 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1,5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 мМ декстрозы, 50 мМ HEPES.

### ***Анализ морфологии шипиков дендритов нейронов***

Для оценки результатов иммунофлуоресцентного окрашивания, а также для анализа морфологии шипиков проводили исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из конфокального микроскопа ThorLabs, цифровой камеры, персонального компьютера и программного обеспечения «ThorLabs» (США). Данные

анализировали путем получения серии срезов при 100-кратном увеличении (Olympus UPlanSApo). Каждое изображение имело размер  $1024 \times 1024$  пикселя, а интервал сканирования конфокального микроскопа был равен 0,2 мкм.

Полученные с помощью конфокального микроскопа изображения препаратов кортико-стриатных и гиппокампальных культур нейронов анализировали с использованием программного обеспечения Neuron Studio согласно методике, описанной в статье [Sun S. et al., 2014].

Программа позволяет проводить трехмерную реконструкцию дендритного дерева нейрона и автоматизированный подсчет шипиков. Также данное программное обеспечение предоставляет возможность измерять длину отростков на основе данных размера пикселя при конфокальной микроскопии, задавать параметры для детектирования разных типов шипиков: пенькового, тонкого или грибовидного. Таким образом, программа детектирует разные типы шипиков точками различных цветов. Мы использовали следующие параметры для анализа шипиков: min stubby size (минимальный размер пенькового шипика) – 26, non stubby size (минимальный размер непенькового шипика) – 36. Плотность распределения шипиков определяли, как среднее количество шипиков на 10 мкм длины дендрита.

### ***Статистическая обработка результатов***

Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 6.0. Непараметрический U-критерий Манна-Уитни использовали для проверки гипотезы о том, что сравниваемые независимые выборки отличаются друг от друга. Для сравнения двух выборок использовали критерий Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### ***Изменение количества шипиков нейронов в кортико-стриатной культуре при ее старении в норме и в модели болезни Хантингтона***

Количество шипиков в кортико-стриатной культуре нейронов мышей дикого типа на 14 и 21 сут культивирования достоверно не изменялось и составило соответственно  $(9,8 \pm 0,4)$  и  $(9,9 \pm 0,4)$  шипиков на 10 мкм дендрита (рис. 1, 2). Количество шипиков у мышей линии YAC128 на 14 сут культивирования составило  $(9,6 \pm 0,5)$  шипиков на 10 мкм длины дендрита. При старении кортико-стриатной культуры мышей линии YAC128 наблюдалось уменьшение количества шипиков на 25% по сравнению со значением количества шипиков на 14 сут культивирования, значение составило  $(7,2 \pm 0,5)$  шипиков на 10 мкм длины дендрита, и на 27% по сравнению с диким типом на 21 сут культивирования.

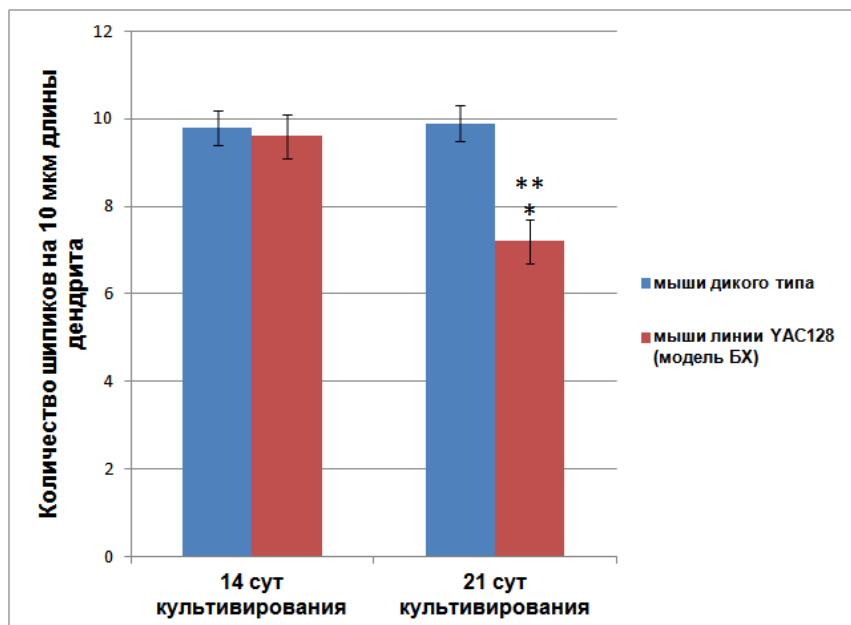


Рисунок 1. Элиминация шипиков в кортико-стриатной культуре нейронов мышей линии YAC128 на 21 сут культивирования. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с количеством шипиков в культурах, полученных от мышей линии YAC128 на 14 сут культивирования, \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с количеством шипиков в культурах, полученных от мышей дикого типа на 21 сут культивирования.

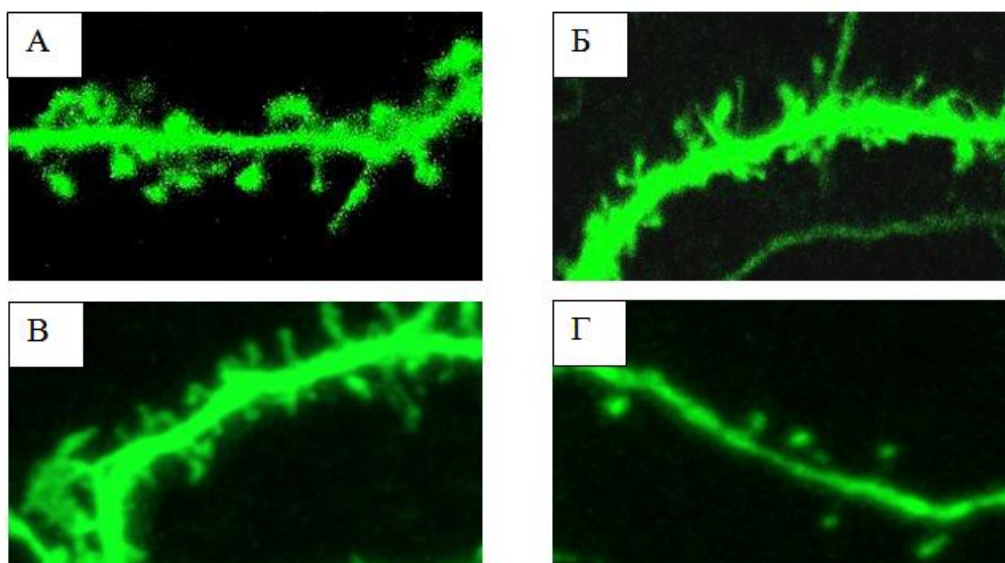


Рисунок 2. Микрофотографии фрагмента дендрита кортико-стриатной культуры нейронов. Иммуноцитохимический анализ с антителами к DARPP-32 (вторичные антитела Alexa 488 – зеленая флуоресценция),  $\times 100$ . А – культуры, полученные от мышей дикого типа, 14 сут культивирования; Б - культуры, полученные от мышей дикого типа, 21 сут культивирования; В - культуры, полученные от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), 14 сут культивирования; Г - культуры, полученные от мышей линии YAC128, 21 сут культивирования.

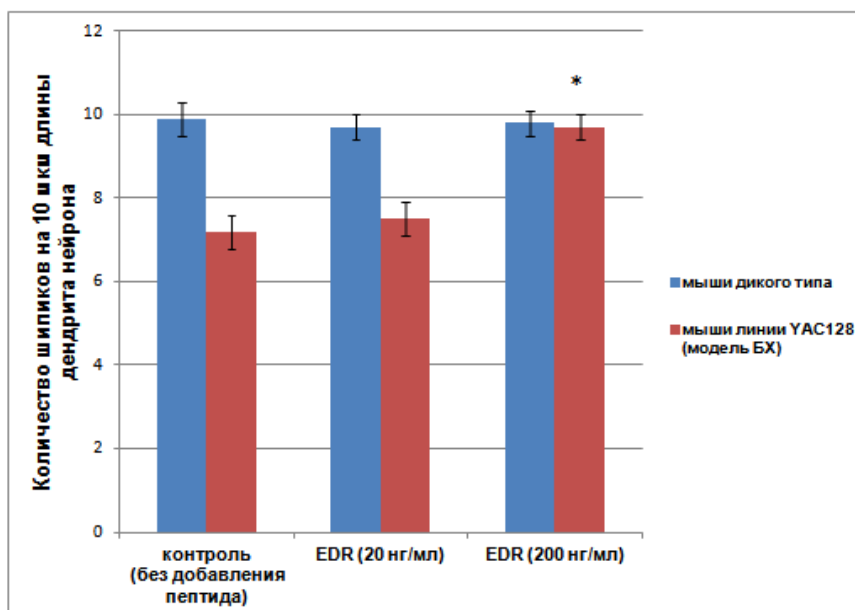
Полученные данные показывают, что в кортико-стриатной культуре при ее старении при болезни Хантингтона происходят морфологические изменения строения шипиков и их элиминация. Это приводит к нарушению синаптических

связей между нейронами стриатума и коры. Количество шипиков на 21 сут культивирования у мышей линии YAC128 уменьшалось на 25% по сравнению с 14 сут культивирования. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами [Артамонов Д.Н. и др., 2013; Wu J. et al., 2016].

***Влияние пептида EDR на количество шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов в норме и в модели болезни Хантингтона***

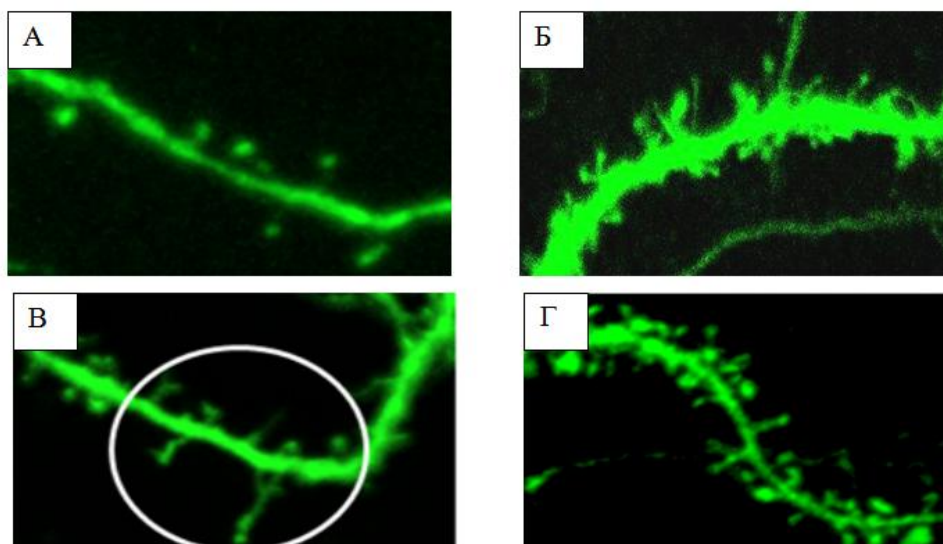
При исследовании влияния пептида EDR на количество шипиков в нейронах кортико-стриатной культуры мышей линии YAC128 было установлено, что пептид в концентрации 20 нг/мл не влияет на количество шипиков, число которых составило  $(7,5 \pm 0,4)$  на 10 мкм длины дендрита (рис. 3, 4). Однако добавление пептида EDR в концентрации 200 нг/мл способствовало изменению морфологии нейронов культуры YAC128 на 21 сут культивирования. Добавление пептида EDR приводило к изменению формы шипиков, которые приобретали вид филоподий. При добавлении пептида EDR в концентрации 200 нг/мл наблюдалось увеличение количества шипиков на 35% с  $(7,2 \pm 0,5)$  до  $(9,7 \pm 0,3)$  на 10 мкм длины дендрита. При добавлении пептида EDR в кортико-стриатную культуру нейронов, полученных от мышей дикого типа, на 14 и 21 сут культивирования изменения количества шипиков не наблюдалось (рис. 3, 4).

Таким образом, пептид EDR в модели болезни Хантингтона показал выраженные нейропротекторные свойства. Пептид EDR способствовал восстановлению морфологии и количества шипиков нейронов коры и стриатума головного мозга мышей линии YAC128 при старении кортико-стриатной культуры. Ранее было установлено, что пептид EDR обладает нейропротекторным действием у лиц пожилого возраста [Умнов Р.С. и др., 2013].



**Рисунок 3.** Влияние пептида EDR на количество шипиков в кортико-стриатной культуре нейронов мышей дикого типа и мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона).

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с количеством шипиков в культурах, полученных от мышей линии YAC128 на 21 сут культивирования.



*Рисунок 4.* Микрофотографии фрагмента дендрита кортико-стриатной культуры нейронов. Иммуноцитохимический анализ с антителами к DARPP-32 (вторичные антитела Alexa 488 – зеленая флуоресценция),  $\times 100$ . А – культуры, полученные от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), 21 сут культивирования; Б - культуры, полученные от мышей дикого типа, 21 сут культивирования; В - культуры, полученные от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), добавление пептида EDR в концентрации 20 нг/мл; Г – культуры, полученные от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), добавление пептида EDR в концентрации 200 нг/мл.

***Влияние пептида KED на количество шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов в норме и в модели болезни Хантингтона***

При добавлении пептида KED в концентрациях 20 и 200 нг/мл в кортико-стриатную культуру нейронов, полученную от мышей линии YAC128, достоверного изменения количества шипиков не наблюдалось -  $(7,4 \pm 0,4)$  и  $(7,6 \pm 0,3)$  на 10 мкм длины дендрита, соответственно (рис. 5, 6). При добавлении пептида KED в кортико-стриатную культуру нейронов, полученных от мышей дикого типа, изменение количества шипиков также не происходило. В культуре мышей дикого типа при добавлении пептида KED на 14 и 21 сут культивирования количество шипиков составило  $(9,9 \pm 0,3)$  и  $(9,8 \pm 0,3)$  на 10 мкм длины дендрита (рис. 5, 6).

Таким образом, пептид KED не оказывал влияния на количество шипиков в кортико-стриатной культуре мышей линии YAC128 при болезни Хантингтона. KED известен как ангиопротекторный пептид [Хавинсон В.Х. и др., 2006].

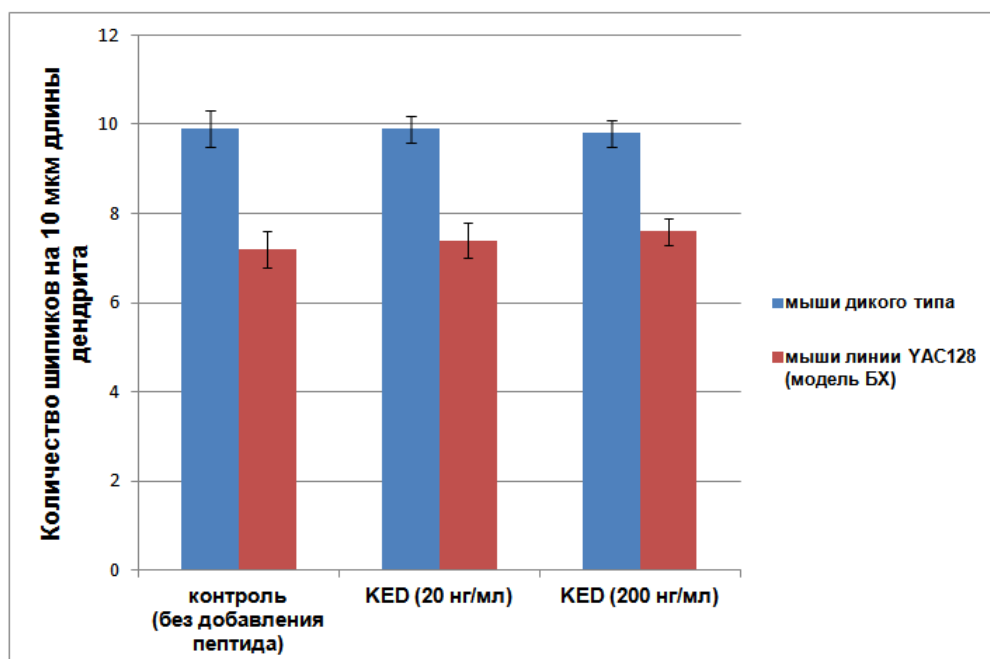


Рисунок 5. Влияние пептида KED на количество шипиков в кортико-стриатной культуре нейронов мышей дикого типа и мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона).

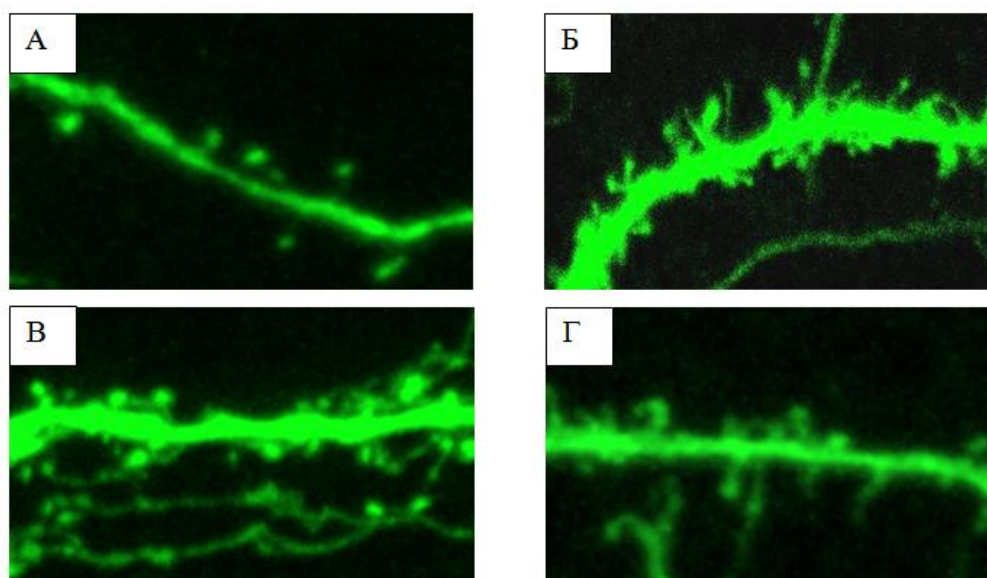


Рисунок 6. Микрофотографии фрагмента дендрита кортико-стриатной культуры нейронов. Иммуноцитохимический анализ с антителами к DARPP-32 (вторичные антитела Alexa 488 – зеленая флуоресценция), x100. А – культуры, полученные от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), 21 сут культивирования; Б - культуры, полученные от мышей дикого типа, 21 сут культивирования; В - культуры, полученные от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), добавление пептида KED в концентрации 20 нг/мл; Г – культуры, полученные от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), добавление пептида KED в концентрации 200 нг/мл.

В сочетанном действии с пептидом EDR пептид KED оказывал положительный эффект на функции памяти, внимания, мышления, ускорение

перцептивно-моторных реакций, повышение умственной работоспособности, что, вероятно, было связано с его воздействием на сосуды головного мозга, но не на нейроны [Башкирева А.С. и др., 2012].

В экспериментах на данной мышинной модели болезни Хантингтона (мышь линии YAC128) ранее были изучены вещества Дантролен [Chen X., et al, 2011] и Тетрабеназин [Wang H., et al, 2010]. Были получены значительные улучшения в поведенческих тестах у мышей, а также значительное уменьшение потери стриатальных нейронов и образования ядерных агрегатов мутантного хантингтина. Можно сделать предположение, так как пептиды EDR и KED оказывали нейропротекторный эффект на нейроны коры и стриатума в кортико-стриатной культуре, то они дадут подобный эффект *in vivo* в этой же мышинной модели болезни Хантингтона.

***Влияние пептидов EDR и KED на количество шипиков в культуре  
нейронов гиппокампа у мышей линии PS1-M146V-KI  
(модель болезни Альцгеймера)***

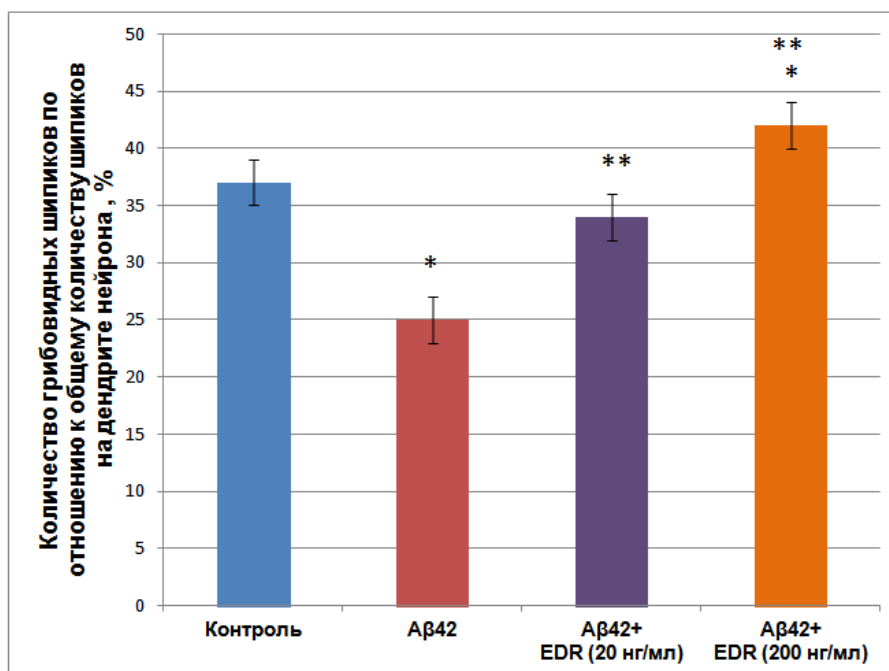
В модели болезни Альцгеймера на нокиновых мышях линии PS1-M146V-KI пептиды EDR и KED не оказывали нейропротекторного действия на нейроны. Только в контрольных культурах были найдены здоровые трансфеницированные нейроны. Таким образом, в данной модели исследование не дало репрезентативных результатов вследствие низкой способности нейронов, полученных от нокиновых мышей линии PS1-M146V-KI, расти в культуре при добавлении изучаемых пептидов.

Как было показано ранее в экспериментах на модели болезни Альцгеймера - трансгенные мыши линии 3xTg-AD с мутациями в генах пресенилина-1, APP и  $\tau$ -протеина, Вогонин способствовал уменьшению количества амилоидных бляшек в коре и гиппокампе головного мозга, а также улучшению реакции в поведенческих тестах (распознавание новых объектов и лабиринт) [Huang D.S. et al., 2017]. В другом исследовании на мышях с аналогичной тройной мутацией в генах, среди которых есть мутация PS1-M146V-KI (модель болезни Альцгеймера с мутантным геном белка пресенилина-1), было выявлено, что подкожное введение полусинтетического алкалоида Апоморфин 1 раз в неделю в течение 1 месяца улучшало функцию памяти и снижало количество амилоидных бляшек и агрегатов  $\tau$ -протеина внутри нейрона [Jimeno E. et al., 2011].

Таким образом, Вогонин и Апоморфин оказывали нейропротекторный эффект в модели болезни Альцгеймера у мышей линии PS1-M146V-KI. Из полученных нами данных и данных из анализируемой литературы можно сделать заключение о том, что культуры нейронов гиппокампа, полученные от мышей линии PS1-M146V-KI (модель болезни Альцгеймера), не подходят для изучения влияния пептидов EDR и KED. Возможно, что данная модель применима только для исследований пептидных субстанций *in vivo*, но это требует дополнительного изучения, выходящего за рамки нашей работы.

**Влияние пептида EDR на количество шипиков в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синапсотоксичности  
(модель болезни Альцгеймера)**

Количество грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа мышей линии C57BL/6 в контроле составило  $(37,7 \pm 2,1)\%$ . При добавлении синтетических олигопептидов A $\beta$ 42 (создание амилоидной синапсотоксичности – модель болезни Альцгеймера) количество грибовидных шипиков нейронов гиппокампа уменьшилось на 34% и составило  $(24,9 \pm 1,8)\%$  (рис. 7, 8).



*Рисунок 7.* Влияние пептида EDR на количество грибовидных шипиков в культуре нейронов гиппокампа мышей линии C57BL/6 в условиях амилоидной синапсотоксичности (добавление пептида A $\beta$ 42 – модель болезни Альцгеймера).

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «контроль»,

\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «A $\beta$ 42».

После добавления в культуру нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синапсотоксичности пептида EDR в концентрации 20 нг/мл количество грибовидных шипиков достоверно увеличивалось на 35% и составило  $(33,6 \pm 2,5)\%$ . При добавлении пептида EDR в концентрации 200 нг/мл наблюдалось не только восстановление количества грибовидных шипиков с  $(24,9 \pm 1,8)\%$  до контрольного значения -  $(37,7 \pm 2,1)\%$ , но и некоторое увеличение количества грибовидных шипиков по сравнению с контролем (культура без добавления олигопептидов A $\beta$ 42) - до  $(42,6 \pm 1,7)\%$ . Таким образом, пептид EDR в концентрации 200 нг/мл способствовал восстановлению количества грибовидных шипиков нейронов в модели болезни Альцгеймера на 71% от уровня контроля (рис. 7, 8).

Пептид EDR оказывал нейропротекторный эффект по отношению к грибовидным шипикам в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синапсотоксичности, в обеих исследуемых концентрациях - 20 и 200 нг/мл. Сравнивая этот результат с ранее полученными данными [Fedoreyeva L.I. et al., 2011; Guryanov S.A. et al., 2006], можно предположить, что пептид EDR проникает в ядро нейрона, связывается с ДНК и запускает или ингибирует экспрессию генов,



ответственных за функциональную активность и пластичность нейронов, вследствие чего наблюдается восстановление грибовидных шипиков и синаптических контактов между нейронами гиппокампа в модели амилоидной синаптотоксичности.

Кроме того, велика вероятность, что пептид EDR входит в состав полипептидного комплекса коры головного мозга телят (лекарственный препарат Кортексин). Вполне возможно, что с этим связан схожий эффект пептида EDR с Кортексином на уровне морфологии нейронов. Как было показано в предыдущих исследованиях, Кортексин повышает выделение дофамина из аксонов нейронов стриатума и одновременно подавляет взаимодействие дофамина с пре- и постсинаптическими рецепторами, что объясняет широкий спектр его нейропротекторного действия [Менджеричкий А.М. и др., 2012]. Также нейропротекторные свойства Кортексина обусловлены его способностью снижать апоптоз и стимулировать пролиферацию нейронов.

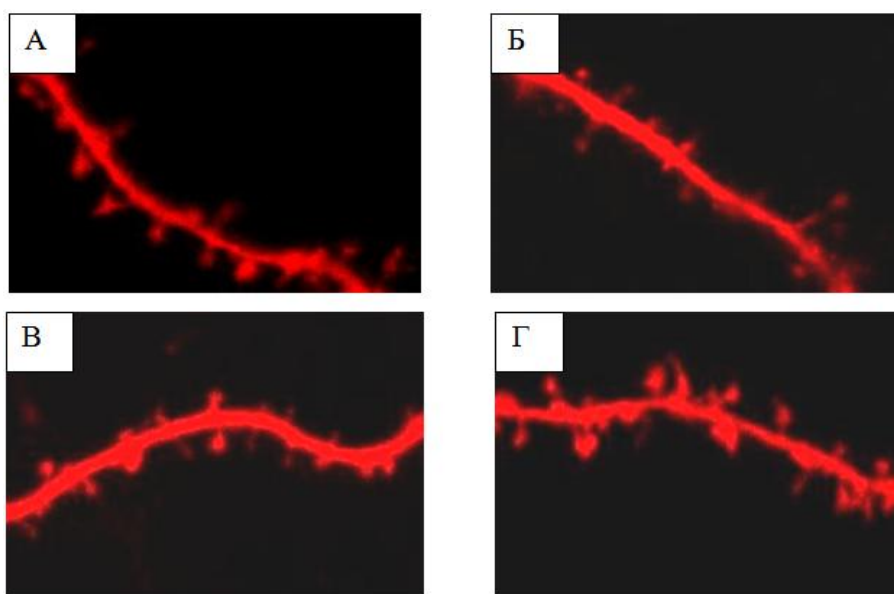


Рисунок 8. Фрагмент дендрита культуры нейронов гиппокампа, трансфецированных плазмидой pCSGFP2:td-tomato,  $\times 100$ . А – контроль; Б - добавление А $\beta$ 42 (модель болезни Альцгеймера); В - добавление А $\beta$ 42 и пептида EDR в концентрации 20 нг/мл; Г – добавление А $\beta$ 42 и пептида EDR в концентрации 200 нг/мл.

***Влияние пептида KED на количество шипиков в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель болезни Альцгеймера)***

Количество грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа мышей линии C57BL/6 в контроле составило  $(37,7 \pm 2,1)\%$ . При добавлении синтетических олигопептидов А $\beta$ 42 (создание амилоидной синаптотоксичности – модель болезни Альцгеймера), количество грибовидных шипиков уменьшилось на 34% и составило  $(24,9 \pm 1,8)\%$  (модель болезни Альцгеймера) (рис. 9, 10).

При добавлении пептида KED в концентрации 20 нг/мл статистически значимых отличий в количестве грибовидных шипиков от группы с добавлением олигопептидов А $\beta$ 42 обнаружено не было – количество грибовидных шипиков было равно  $(27,3 \pm 1,5)\%$ .

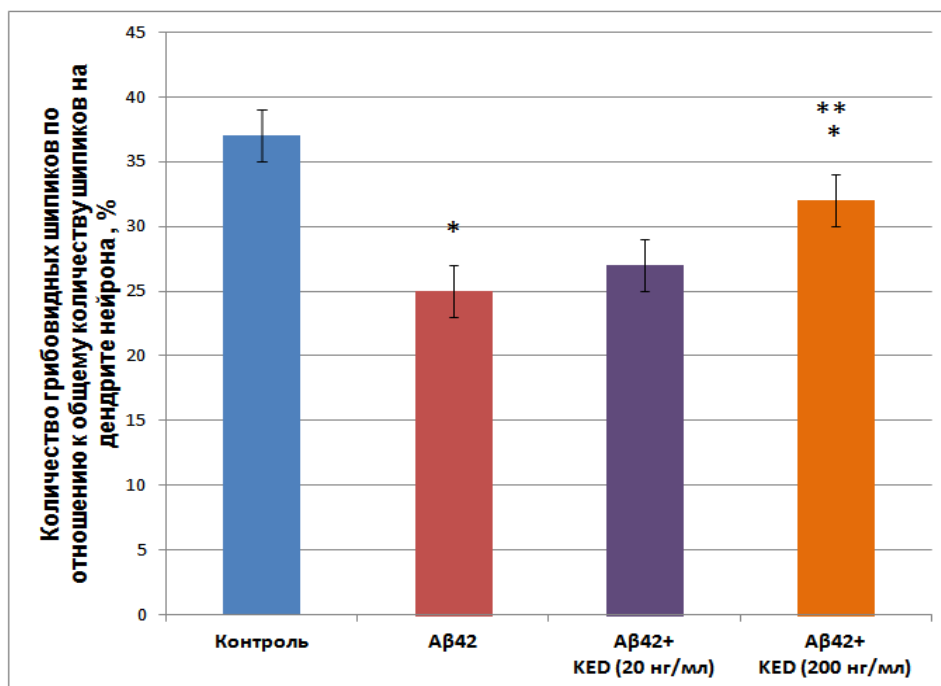


Рисунок 9. Влияние пептида KED на количество грибовидных шипиков в культуре нейронов гиппокампа мышей линии C57BL/6 в условиях амилоидной синаптотоксичности (добавление пептида Aβ42 – модель болезни Альцгеймера).

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «контроль»,

\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Aβ42».

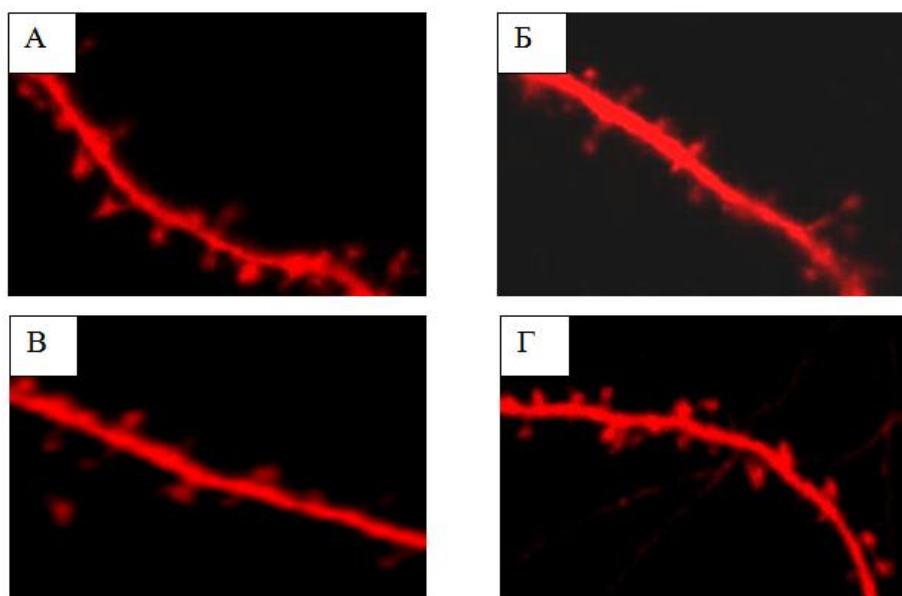


Рисунок 10. Фрагмент дендрита культуры нейронов гиппокампа, трансфицированных плазмидой pCSGFP2:td-tomato, x100. А – контроль; Б - добавление Aβ42 (модель болезни Альцгеймера); В - добавление Aβ42 и пептида KED в концентрации 20 нг/мл; Г – добавление Aβ42 и пептида KED в концентрации 200 нг/мл.

При этом в концентрации 200 нг/мл пептид KED повышал количество грибовидных шипиков на 20% по сравнению с группой с добавлением Aβ42. Несмотря на увеличение количества грибовидных шипиков при добавлении

пептида KED в концентрации 200 нг/мл, этого оказывалось недостаточно для полного восстановления числа шипиков до контрольных значений -  $(32 \pm 1,9)\%$  (рис. 9, 10).

В выбранной модели болезни Альцгеймера в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности происходило увеличение количества грибовидных шипиков при воздействии на культуру пептидом KED в концентрации 200 нг/мл на 20%. Так как наблюдается положительный эффект при воздействии данного пептида, можно рекомендовать сочетанное изучение пептида KED с другими пептидами, например, пептидом EDR, который оказывал положительный эффект, в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона. Кроме того, по литературным данным показана эффективность сочетанного клинического применения этих пептидов [Башкирева А.С. и др., 2012]. Возможно, применение нейропротекторного и ангиопротекторного пептидов (EDR и KED) даст более выраженный эффект при лечении нейродегенеративных заболеваний, так как при данных заболеваниях наблюдается не только нарушение синаптических контактов между определенными отделами головного мозга, но и в ряде случаев - нарушение кровоснабжения головного мозга.

Ранее было показано, что предварительная обработка культуры гиппокампальных нейронов в мышинной модели Thy-1-YFP Мемантином перед облучением предотвращала потерю шипиков и синаптических контактов [Duman J.G., et al., 2017]. В дальнейшем, целесообразно проверить нейропротекторные свойства исследуемых пептидов и на других мышинных моделях. Скорее всего, данные пептиды окажут положительный эффект.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение организма неизбежно сопровождается инволютивными изменениями во всех органах и системах. Старение влияет на многие внутриклеточные процессы, повышая предрасположенность к развитию нейродегенеративных заболеваний. Накопление ассоциированных с возрастом соматических повреждений, в комплексе со снижением эффективности компенсаторных механизмов, может повышать вероятность развития нейродегенеративных заболеваний. Термином нейродегенеративные заболевания определяется большая группа заболеваний преимущественно характерных для лиц старше 60 лет, при которых наблюдается медленная прогрессирующая гибель определенных групп нейронов и нарастающая атрофия соответствующих отделов головного и/или спинного мозга. Наиболее известными представителями этого класса заболеваний человека являются болезни Альцгеймера и Хантингтона. Поскольку в развитых странах мира наблюдается неуклонное старение населения, общая частота нейродегенеративных заболеваний повышается. При этом следует помнить, что указанные нейродегенеративные заболевания затрагивают психику человека (потеря памяти и, в конечном счете, деменция при болезни Альцгеймера), и его способность перемещаться в пространстве и обслуживать себя (скованность, дрожание, расстройства ходьбы при болезни Хантингтона). Это обуславливает социальную значимость нейродегенеративных заболеваний [Иллариошкин С.Н., 2008]. Ранее было установлено, что пептиды EDR и KED обладают нейропротекторным и ангиопротекторным действием, соответственно. Применение пептидов KED и EDR у людей пожилого возраста приводило к улучшению функций памяти, внимания, мышления, ускорению перцептивно-моторных

реакций, повышению умственной работоспособности, уменьшению степени постарения ЦНС [Башкирева А.С. и др., 2012]. Однако молекулярно-клеточные механизмы и биологическая активность этих пептидов мало изучены.

Формирование дендритов является важным этапом в процессе нейрогенеза, обеспечивая взаимодействие нейронов и функционирование нейронных сетей. При этом дендритное дерево представляет собой динамичную структуру, с одной стороны, изменяющуюся под действием афферентных сигналов, а с другой – поддерживаемую постсинаптическими сигналами [Li S. et al., 2006]. Показано нарушение морфологии дендритов, включая изменения количества шипиков, при развитии нейродегенеративных и психических заболеваний. Эти нарушения наблюдаются при болезни Альцгеймера и болезни Хантингтона в головном мозге людей и при моделировании данных заболеваний на животных [Kuhn A., 2007; Безprozванный И.Б., 2010]. В работе впервые было изучено влияние пептидов EDR и KED на формирование шипиков в нейронах стриатума в смешанной кортико-стриатной культуре, полученной от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона), и в нейронах гиппокампа, полученной от мышей линии C57BL/6 и линии PS1-M146V-KI (модель болезни Альцгеймера). Было установлено, что пептид EDR оказывал нейропротекторные свойства в моделях болезни Хантингтона и болезни Альцгеймера. При исследовании влияния пептида EDR на количество шипиков в нейронах кортико-стриатной культуры мышей линии YAC128 было установлено, что пептид в концентрации 200 нг/мл достоверно увеличивал количество шипиков на 35% по сравнению с этим показателем у мышей с геном мутантного хантингтина человека на 21 сут культивирования без добавления пептида. При добавлении пептида EDR в концентрации 20 нг/мл достоверного изменения количества шипиков не происходило, но изменялась морфология шипиков – образовывались филоподии - выпячивания дендрита, похожие на шипики, но длиннее его в 2-3 раза. Филоподии являются динамичной структурой. Образование филоподий после добавления пептида EDR могло быть связано с попыткой дендрита образовать функциональный контакт с аксоном кортикального нейрона, но данной концентрации было недостаточно.

Так как в экспериментах на мышинной модели болезни Хантингтона (мышь линии YAC128) применение Дантролена [Chen X., et al, 2011] и Тетрабеназина [Wang H., et al, 2010] значительно улучшало поведение в тестах у мышей, а также уменьшало потери стриатальных нейронов и образования ядерных агрегатов мутантного хантингтина, можно предположить что пептиды EDR и KED, которые оказывали нейропротекторный эффект на нейроны стриатума в кортико-стриатной культуре, дадут подобный положительный эффект *in vivo* в этой же мышинной модели болезни Хантингтона.

При изучении влияния пептида EDR на количество грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель болезни Альцгеймера) установлено, что пептид EDR также оказывал положительный эффект на формирование грибовидных шипиков в концентрациях пептида 20 и 200 нг/мл. После добавления в культуру нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности пептида EDR в концентрации 20 нг/мл количество грибовидных шипиков достоверно увеличивалось на 35%. При добавлении пептида EDR в концентрации 200 нг/мл наблюдалось не только восстановление количества грибовидных шипиков до контрольного значения, но и некоторое увеличение количества грибовидных шипиков по сравнению с

контролем (культура без добавления олигопептидов A $\beta$ 42). Таким образом, пептид EDR в концентрации 200 нг/мл способствовал восстановлению количества грибовидных шипиков нейронов в модели болезни Альцгеймера на 71% от уровня контроля. Полученные данные позволяют заключить, что пептид EDR оказывал нейропротекторный эффект, восстанавливая количество шипиков дендритов нейронов в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона на животных. Ранее было установлено, короткие пептиды проникают в ядро клетки, взаимодействуют с ДНК и регулируют экспрессию генов, которые способствуют улучшению функциональной активности клеток в различных тканях [Fedoreyeva L.I. et al., 2011]. Скорее всего, нейропротекторный эффект пептида EDR связан с влиянием на экспрессию генов, обеспечивающих пластичность нейронов и их функционирование.

Пептид KED не оказывал такого выраженного положительного эффекта при изучении его влияния на восстановление шипиков в нейронах стриатума в смешанной кортико-стриатной культуре, полученной от мышей линии YAC128 (модель болезни Хантингтона) и в нейронах гиппокампа в гиппокампальной культуре, полученной от мышей линии C57BL/6. При добавлении пептида KED в концентрациях 20 и 200 нг/мл в смешанную кортико-стриатную культуру нейронов, полученную от мышей линии YAC128, достоверного изменения количества шипиков не наблюдалось. В модели болезни Альцгеймера при добавлении пептида KED в концентрации 20 нг/мл статистически значимых отличий в количестве грибовидных шипиков от группы с добавлением олигопептидов A $\beta$ 42 обнаружено не было. При этом в концентрации 200 нг/мл пептид KED повышал количество грибовидных шипиков на 20% по сравнению с группой с добавлением A $\beta$ 42, но полного восстановления грибовидных шипиков не происходило. Возможно, данный эффект связан с неспецифическим действием этого трипептида. Ранее было показано, что пептиды EDR и KED оказывали положительное влияние при сочетанном лечении нейродегенеративных заболеваний. Возможно, применение ангиопротекторного пептида KED, в дополнение к пептиду EDR, эффективно потому, что одной из причин нейродегенеративных заболеваний является сосудистая недостаточность и, как следствие, недостаточное насыщение нейронов головного мозга кислородом [Хавинсон В.Х. и др., 2006]. Оба пептида не оказывали негативного воздействия на культуры клеток, так как при добавлении пептидов в культуры, полученные от мышей дикого типа, количество шипиков достоверно не изменялось, что свидетельствует об отсутствии их нейротоксичности.

Ранее было показано, что предварительная обработка культуры гиппокампальных нейронов в мышинной модели Thy-1-YFP Мемантином перед облучением предотвращала потерю шипиков и синаптических контактов [Duman J.G., et al., 2017]. В дальнейшем, целесообразно проверить нейропротекторные свойства исследуемых пептидов и на других мышинных моделях. Скорее всего, данные пептиды окажут положительный нейропротекторный эффект.

Таким образом, пептид EDR, будучи представителем пула регуляторных биологически активных геропротекторных пептидов, является одним из перспективных нейропротекторов для дальнейшего изучения как вещество, эффективное в лечении болезни Альцгеймера и Хантингтона.

## ВЫВОДЫ

1. При старении кортико-стриатной культуры, полученной от мышей линии YAC128 с геном мутантного хантингтина человека (модель болезни Хантингтона), наблюдается нарушение синаптической связи нейронов стриатума: на 21 сут культивирования происходит элиминация 25% шипиков.
2. Пептид EDR в концентрации 200 нг/мл на 35% повышал и восстанавливал до нормы количество шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов, полученной от мышей с болезнью Хантингтона (линия YAC128), при ее старении. В концентрации 20 нг/мл пептид EDR не влиял на количество шипиков нейронов у мышей линии YAC128, но изменял их морфологию – способствовал удлинению шипиков в 2-3 раза и образованию филоподий. Пептид KED не оказывал влияния на формирование шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов в модели болезни Хантингтона при ее старении.
3. Пептид EDR в концентрации 200 нг/мл на 71% повышал количество грибовидных шипиков в культурах нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера (мышь дикого типа линии C57BL/6 в условиях амилоидной синаптотоксичности) до уровня нормы. Пептид EDR в концентрации 20 нг/мл увеличивал количество грибовидных шипиков в культурах нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера на 35%. Пептид KED в концентрации 200 нг/мл увеличивал количество грибовидных шипиков в культурах нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера на 20%. В концентрации 20 нг/мл пептид KED не оказывал такого эффекта.
4. Исследование влияния пептидов EDR и KED в культуре нейронов гиппокампа у мышей линии PS1-M146V-KI (модель болезни Альцгеймера с мутантным геном белка пресенилин-1) не дало репрезентативных результатов.
5. Модель болезни Альцгеймера – культуры нейронов гиппокампа мышей дикого типа линии C57BL/6 в условиях амилоидной синаптотоксичности - является наиболее перспективной для изучения нейропротекторных свойств пептидов по сравнению с моделью с мутантным геном белка пресенилин-1 - мыши линии PS1-M146V-KI, так последняя модель не дала репрезентативных результатов.
6. Пептид EDR обладает более выраженным нейропротекторным эффектом и способностью восстанавливать синаптическую передачу у нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов (модель болезни Хантингтона) и гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера) по сравнению с пептидом KED.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пептид EDR может быть рекомендован для дальнейшего экспериментального изучения с целью создания средств профилактики и лечения болезни Альцгеймера и Хантингтона, так как установлено его нейропротекторное действие на синаптическую передачу в кортико-стриатной культуре нейронов у мышей линии

УАС128 (модель болезни Хантингтона) и в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера).

2. Пептид KED только в концентрации 200 нг/мл в культуре нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности у мышей линии C57BL/6 (модель болезни Альцгеймера) оказывал нейропротекторный эффект, что с учетом выявленных ранее ангиопротекторных эффектов этого пептида позволяет рекомендовать его для изучения в моделях сосудистой патологии головного мозга на животных.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### *Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ*

1. Аβ42 – перспективный неинвазивный маркер для прижизненной диагностики болезни Альцгеймера / В.А. Зуев, Е.М. Пальцева, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, Е.О. Куканова (Кожевникова) // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15, №1. – С. 24-27.
2. Болезнь Паркинсона: от истории возникновения термина к перспективам прижизненной диагностики / М.А. Пальцев, Е.О. Кожевникова, В.А. Зуев, Н.С. Линькова, И.М. Кветной // Успехи физиологических наук. - 2018. - Т. 49, № 2. - С. 3-19.
3. Молекулярные маркеры ранней диагностики болезни Альцгеймера: перспективы исследования в периферических тканях / М.А. Пальцев, В.А. Зуев, Е.О., Кожевникова Н.С. Линькова, Т.В. Кветная, В.О. Полякова, И.М. Кветной // Успехи геронтологии. – 2017. – Т. 30, №6. – С. 809-817.
4. Сигма-1 рецептор как потенциальная фармакологическая мишень при лечении нейропатологии / А.В. Большакова, Е.О. Куканова. (Кожевникова), А.Н. Гайнуллина, В.А. Жемков, С.А. Корбан, И.Б. Безпрозванный // Научно-технические ведомости СПбГПУ. – 2016. – № 1(237). – С. 48-65.
5. Трипептиды восстанавливают количество шипиков нейронов в модели болезни Альцгеймера *in vitro* / Н.А. Красковская, Е.О.Куканова (Кожевникова), Н.С. Линькова., Е.А. Попугаева, В.Х. Хавинсон // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – Т.2. – С. 101-104.

### *Статьи в других журналах*

6. Neuroprotective Effect of EDR Peptide in Mouse Model of Huntington Disease/ V.Kh. Khavinson, N.S. Linkova, E.O. Kukanova (Kozhevnikova), A.V. Bolshakova, A.N. Gainullina, S.M. Tendler, E.A. Morozova, S.I. Tarnovskaya, D.S. Pada Vinski, V.M. Bakulev., N.A. Kasyanenko // Journal of Neurology and Neuroscience. – 2017. – Vol. 8, No.1:166. – P. 1-11.

### *Главы в монографиях*

7. Очерк 3. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в головном мозге при болезни Хантингтона (в соавторстве с В.А. Зуевым, Е.О. Кукановой (Кожевниковой)) в книге М.А. Пальцев, И.М. Кветной, В.О. Полякова, Е.М.Пальцева, С.У.Мурсалов, У.К. Мурсалов, Н.С. Линькова, Р.Дж. Рейтер. Молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний (лекционные очерки). – СПб.: Изд-во Н-Л, 2016. – 176 с.

8. Часть 1. Сигнальные мессенджеры нейроиммуноэндокринной системы. Лекция 2. Экспрессия генов и рецепция пептидов. Пептидергическая регуляция внутриклеточных процессов (в соавторстве с Н.С. Линьковой, А.В. Костылевым, Е.О. Кукановой (Кожевниковой)). В книге «Избранные лекции по нейроиммуноэндокринологии». Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О., Пальцева Е.М., Мурсалов С.У. – М.: Издательство «Шико», 2015. – 280 с.
9. Часть 2. Молекулярная морфология: примеры приложения методов для диагностики, оценки прогноза и качества лечения основных социально значимых заболеваний. Занятие 17. Роль и место нейроиммуноэндокринологии в практической молекулярной медицине. В учебном пособии для практических занятий в системе высшего последипломного образования. Молекулярная морфология. Методические и прикладные аспекты нейроиммуноэндокринологии. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О., Пальцева Е.М., С.У. Мурсалов. – М.: Издательство «Шико», 2015. – 264 с.

#### *Тезисы докладов*

10. Буккальный эпителий как объект для ранней диагностики болезни Альцгеймера / Т.В. Кветная, В.А. Зуев, Н.А. Красковская, Е.О. Куканова (Кожевникова), Н.С. Линькова // VI Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии». - 2017. – Сб. тез. - С. 129.
11. Исследование морфологии средних шипиковых нейронов при болезни Хантингтона / Е.О. Куканова (Кожевникова), А.В. Большакова, Н.С. Линькова, О.Л. Власова, И.Б. Безпрозванный // Матер. научно-практической конф. с международным участием «Неделя Науки СПбПУ». – СПб. – 2014. – С. 432-434.
12. Нейропротекторное действие пептида КЕД в моделях болезней Альцгеймера и Хантингтона *in vitro* / Е.О. Куканова (Кожевникова), Н.А. Красковская, А.В. Большакова, Е.А. Попугаева, Н.С. Линькова // Сб. матер. научно-практической конф. с международным участием «Неделя Науки 2016». – СПб. – 2016. – С. 52-55.
13. Нейропротекторное действие пептида КЕД в модели болезни Хантингтона / Е.О. Куканова (Кожевникова), Н.С. Линькова, А.В. Большакова, В.Х. Хавинсон // Каталог международного форума «Старшее поколение». – СПб. – 2016. – С. 74-75.
14. Нейропротекторное действие трипептидов в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона / Н.С. Линькова, Е.О. Куканова (Кожевникова), Н.А. Красковская, А.В. Большакова, Е.А. Попугаева, В.Х. Хавинсон // VI Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии». - 2017. – Сб. тез. – С. 139.
15. Нейропротекторные свойства коротких пептидов в условиях амилоидной синаптотоксичности при моделировании болезни Альцгеймера / Н.С. Линькова, Н.А. Красковская, Е.О. Кожевникова, Е.О. Попугаева, В.Х. Хавинсон // Матер. научно-практической конф. «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии 2017», посвященной 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии. - СПб. - 2017. - С. 42.
16. Сигма-1 рецептор как потенциальная мишень при лечении болезни Хантингтона / Е.О. Куканова (Кожевникова), А.В. Большакова, О.Л. Власова, И.Б. Безпрозванный // Матер. научного форума с международным участием «Неделя Науки СПбПУ». – СПб. – 2015. – С. 450-452.
17. Трипептиды восстанавливают количество шипиков нейронов в моделях болезни Альцгеймера и Хантингтона *in vitro* / Н.С. Линькова, Е.О. Куканова (Кожевникова),



- Н.А. Красковская, В.Х. Хавинсон // Международная научная конф. по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды». – 2017. – Аста Nature, Спецвыпуск – С. 19.
18. Экспрессия  $Ca^{2+}$ -связывающих белков стриатума в норме и при болезни Хантингтона / Н.А. Красковская, А.В. Большакова, Е.О. Куканова (Кожевникова), П.В. Плотникова, О.Л. Власова, И.Б. Безпрозванный // Сб. матер. к научно-практической конф. с международным участием «Неделя Науки 2016». – СПб. – 2016. – С. 49-52.
  19. Application prospects of the tripeptide EDR in the Huntington's disease treatment: molecular and cellular mechanisms / V.Kh. Khavinson, E.O. Kukanova (Kozhevnikova), A.V. Bolshakova, N.S. Linkova, D.S. Pada Vinski // Book of abstracts. V European congress of preventive, regenerative and anti-aging medicine. – 2016. – P. 43-44.
  20. Linkova N.S. Applications prospects of short peptides for neuroprotection in older persons / N.S. Linkova, E.O. Kukanova (Kozhevnikova), N.A. Kraskovskaya // Book of Abstracts. Experts' opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology. – 2017. – 73-76.
  21. Effect of Sigma 1 receptor in a cellular model of Huntington Disease/ N. Kraskovskaya, A. Bolshakova, E. Kukanova (Kozhevnikova), A. Gainullina, O. Vlasova, I. Bezprozvanny // Neurodegenerative Disiases. – 2017. – V. 17(1). – P. 1728.

**КОЖЕВНИКОВА Екатерина Олеговна** КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИПЕПТИДОВ В МОДЕЛЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ *IN VITRO* // Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30 – геронтология и гериатрия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, СПб. – 2018. – 26 с.

---

Подписано в печать «19» октября 2018 г. Формат 60\*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ \_\_\_\_\_.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии Издательства СПбГЭТУ «ЛЭТИ»  
Издательство СПбГЭТУ «ЛЭТИ»  
197376, С.-Петербург, ул. проф. Попова, 5

## УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

*Артамонов Д.Н. и др.* Нарушения синаптической передачи при болезни Хантингтона на кортико-стриатной модели культуры нейронов // Биологические Мембраны. 2013. Т. 30(4). С. 1–13; *Башкирева А.С. и др.* Пептидергическая коррекция невротических состояний у водителей грузового автотранспорта // Успехи геронтологии. 2012. Т.25, №4. С. 718-728; *Безпрозванный И.Б.* Нейрональная кальциевая сигнализация и нейродегенеративные заболевания // Дисс. доктора биологических наук. СПб. 2010. 287с; *Иллариошкин С.Н.* Ранняя диагностика нейродегенеративных заболеваний // Нервы. 2008. Т. 1. С. 11-13; *Менджеричкий А.М. и др.* Влияние кортексина и пинеалона на содержание моноаминов в мозге крыс // Изв. ВУЗ Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2012. № 4. С. 65-69; *Мясоедов Н.Ф. и др.* Средство и способ профилактики и лечения пациентов с болезнью Альцгеймера. Патент РФ № 2384343. 2010; *Умнов Р.С. и др.* Нейропротекторные эффекты пептидных биорегуляторов у людей разного возраста // Успехи геронтологии. 2013. №26(4). С. 671-678; *Рыжак Г.А. и др.* Кортексин и регуляция функций головного мозга. СПб.:ИКФ «Фолиант». 2003. 208 с; *Хавинсон В.Х. и др.* Пептид, повышающий резистентность капилляров, фармацевтическая композиция на его основе и способ ее применения. Патент РФ № 2295970. 2006; *Хавинсон В.Х. и др.* Короткие пептиды стимулируют экспрессию серотонина в клетках коры головного мозга // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2014. Т. 157, №1. С. 89-93; *Хавинсон В.Х. и др.* Эпигенетические аспекты пептидной регуляции пролиферации эндотелия сосудов при его старении // Успехи геронтологии. 2014. Т.27, №1. С. 108-114; *Anisimov V.N., et al.* Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. N 11. P. 139-149; *Beronja S., et al.* Rapid functional dissection of genetic networks via tissue-specific transduction and RNAi in mouse embryos // Nature Medicine. 2010. V. 16(7). P. 821-827; *Chen X., et al.* Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model // Molecular Neurodegeneration. 2011. V. 6. P. 81; *Dauphinot V., et al.* Relationship Between Comorbidities in Patients With Cognitive Complaint and Caregiver Burden: A Cross-Sectional Study // Journal of the American medical directors association. 2016. Vol. 17(3). P.232–237; *Duman J.G., et al.* Memantine prevents acute radiation-induced toxicities at hippocampal excitatory synapses // Neuro Oncol. 2017; *Fedoreyeva L.I., et al.* Penetration of Short Fluorescence-Labeled Peptides into the Nucleus in HeLa Cells and in vitro Specific Interaction of the Peptides with Deoxyribooligonucleotides and DNA // Biochemistry. 2011. V. 76, № 11. P. 1210-1219; *Guryanov S.A. et al.* Fluorescently labeled differentiating myelopeptide-4: Specific binding to and penetration into target cells // Russian Journal Bioorganic Chemistry. 2006. V. 32. P. 517-520; *Gutekunst C.A., et al.* Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. P. 2522-2534; *Hardy J.* The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal // J. Neurochem. 2009. Vol. 110(4). P. 1129-1134; *Harper P., et al.* Huntington's disease // New York: Oxford University Press. 2002. P. 558; *Himeno E., et al.* Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- $\beta$  degradation // Ann Neurol. 2011. V. 69(2). P. 248-56; *Huang D.S., et al.* Protective Effects of Wogonin against Alzheimer's Disease by Inhibition of Amyloidogenic Pathway // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2017. 3545169; *Imarisio S., et al.* Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies // Biochem J. 2008. V. 412. P. 191-209; *Jiang M., et al.* High Ca<sup>2+</sup>-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures // Nature Protocols. 2006. V. 1(2). P. 695-700; *Khavinson V.Kh., et al.* Method of Creating a Cell Monolayer Based on Organotypic Culture for Screening of Physiologically Active Substances // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. V. 153, N.5. – P. 795-799; *Khavinson V.Kh.* Peptide Regulation of Gene Expression and Protein Synthesis in Bronchial Epithelium // Lung. 2014. 192: 781-791; *Kuhn A.* Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage // Hum. Mol. Genet. 2007. V. 16. P. 1845-1861; *Kulkarni V.A. et al.* The dendritic tree and brain disorders // Molecular and Cellular Neuroscience. 2012. V. 50. P. 10-20; *Li S., et al.* Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease // Molecular Neurodegeneration. 2006. V. 1. P. 19; *Slow E.J., et al.* Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease // Hum Mol Genet. 2003. V. 12. P. 1555-1567; *Small S.A., et al.* Linking A beta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis // Neuron. 2008. V 60(4). P. 534-542; *Sun S., et al.* Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store-Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice // Neuron. 2014. V. 82. P. 79-93; *Wang H., et al.* Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice // Molecular Neurodegeneration. 2010. V. 5. P.18; *Wu J. et al.* Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model // J Neuroscience. 2016. V. 36(1). P. 125-141; *Zhu X., et al.* HDAC3 negatively regulates spatial memory in a mouse model of Alzheimer's disease // Aging Cell. 2017. V. 16(5). P. 1073-1082.