

*На правах рукописи*

**ЗУЕВ**

**Василий Александрович**

**ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ – МАРКЕРОВ  
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ТКАНЯХ  
У ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА**

**14.01.30 – геронтология и гериатрия**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Санкт-Петербург – 2020**

Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Научные консультанты:

з.д.н. РФ, доктор медицинских наук, профессор  
Кветной Игорь Моисеевич

доктор биологических наук, доцент  
Линькова Наталья Сергеевна

Официальные оппоненты:

Чирский Вадим Семенович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, кафедра патологической анатомии, заведующий кафедрой, главный патологоанатом Министерства обороны РФ.

Виноградова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, ВГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», кафедра фармакологии, организации и экономики фармации медицинского института, заведующая кафедрой.

Павлова Татьяна Васильевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», заведующая кафедрой патологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета Д 521.103.01 в АННО ВО 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 ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного Совета,  
доктор биологических наук,  
профессор

Козина Людмила Семеновна

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП) являются нейродегенеративными патологиями, развивающимися преимущественно у людей пожилого и старческого возраста. Наблюдаемое в последнее десятилетие неуклонное старение населения в развитых странах мира приводит к увеличению частоты возникновения нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим БА и БП представляют собой актуальную медико-социальную проблему геронтологии и гериатрии.

Патогенез БА связан с поражением гиппокампа и других областей головного мозга, ответственных за формирование памяти [Anand R. et al., 2014; Ankarcrona M. et al., 2016]. Двумя основными гистологическими признаками БА являются накопление в головном мозге пациентов сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Формирование нейрофибриллярных клубков в основном связано с внутриклеточным накоплением в нейронах гиперфосфорилированного  $\tau$ -протеина, в то время как сенильные бляшки являются внеклеточными отложениями агрегатов различных бета-амилоидных пептидов (А $\beta$ ). Главенствующей теорией возникновения БА на сегодняшний день является «амилоидная гипотеза», согласно которой повышенная продукция пептида А $\beta$  длиной в 42 аминокислотных остатка (А $\beta$ 42) приводит к потере синаптических связей нейронов в гиппокампе, коре и субкортикальных областях головного мозга [Armstrong R.A., 2014]. Однако ни «амилоидная гипотеза», ни другие теории происхождения БА не дают полного представления о причине этого заболевания [Popugaeva E., Vezprozvanny I., 2014].

Применяемая в настоящее время терапия БА наиболее результативна на ранних стадиях развития заболевания. Однако именно на ранней стадии дифференциальная диагностика БА и других деменций затруднительна. Для диагностики БА широко используются критерии NINCDS–ADRDA (the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association), предложенные в 1984 г. В соответствии с этими критериями для постановки диагноза БА необходимо подтвердить наличие деменции и исключить все иные причины, основываясь на данных анамнеза, результатах психоэмоционального тестирования и лабораторных показателях. Оценка психоэмоционального состояния не решает проблему ранней диагностики, поскольку становится информативной только при развитии выраженной степени когнитивных нарушений. Объективным показателем является гистологическое подтверждение БА методом иммуногистохимии, которое возможно только после смерти пациента. В связи с этим в настоящее время ведется активный поиск периферических тканей (лимфоциты крови, фибробласты кожи, буккальный эпителий, спинномозговая жидкость (СМЖ)), которые могут экспрессировать сигнальные молекулы, верифицируемые в гиппокампе и других отделах головного мозга при БА [Khan T.K. et al., 2015; Kvetnoy I.M. et al., 2015].

БП - вторая в мире по распространенности нейродегенеративная патология после БА. Это хроническое прогрессирующее заболевание, преимущественно связанное с гибелью нейронов черной субстанции и приводящее к нарушению функции базальных ганглиев в условиях дофаминергического дефицита [Михайлусова О.И., Куташов В.А., 2015]. БП проявляется сочетанием гипокинезии и ригидности, тремора покоя, постуральной неустойчивостью, психическими и вегетативными расстройствами. Основное отличие БП от БА в том, что последней присущи когнитивные расстройства – в частности, ухудшение памяти и поведенческих функций. В основе БП лежит расстройство двигательной активности [Pahwa R., Lyons K.E., 2007].

В качестве возможных факторов, способствующих развитию БП, рассматриваются: возраст, генетическая предрасположенность, воздействие факторов окружающей среды, оксидативный стресс. Предполагают, что на молекулярном уровне развитие БП происходит вследствие нарушения метаболизма  $\alpha$ -синуклеина (образование телец Леви) в головном мозге. Считается, что окислительный стресс, митохондриальная дисфункция и генетическая предрасположенность приводят к гиперагрегации  $\alpha$ -синуклеина, а накопление агрегированной формы  $\alpha$ -синуклеина является причиной повреждения синапсов и дегенерации дофаминергических и других типов нейронов [Overk S.R., Masliah E., 2014].

Помимо теории развития БП, связанной с формированием телец Леви из агрегированной формы  $\alpha$ -синуклеина, существуют также свободнорадикальная и митохондриальная теории развития заболевания [Jokinen P. et al., 2009; Betarbet R. et al., 2000]. Существующая в настоящее время диагностика заболевания оценивает проявившиеся у пациента моторные симптомы, что обычно означает значительную степень разрушения дофаминергических систем головного мозга.

Принимая во внимание растущую распространенность БА и БП, важным направлением исследований представляется нахождение методов ранней диагностики БА и БП. Разработка предиктивных методов диагностики БА и БП позволит своевременно начинать терапию этих заболеваний, что будет способствовать повышению качества жизни пациентов старших возрастных групп.

### **Цель и задачи исследования**

Целью исследования явилась верификация в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи людей разного возраста сигнальных молекул – специфических маркеров болезней Альцгеймера и Паркинсона. Для достижения указанной цели поставлены следующие задачи:

1. Оценить степень выраженности экспрессии маркеров апоптоза и клеточного старения (p16, p53) в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи людей пожилого и старческого возраста в норме, при болезни Альцгеймера и при болезни Паркинсона.
2. Провести сравнительный анализ характера экспрессии пептида A $\beta$ 42 в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах

- кожи людей пожилого и старческого возраста в норме, при болезнях Альцгеймера и Паркинсона.
3. Оценить степень выраженности экспрессии протеинкиназы С в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи людей пожилого и старческого возраста в норме, при болезнях Альцгеймера и Паркинсона.
  4. Провести сравнительный анализ характера экспрессии  $\tau$ -протеина и  $\alpha$ -синуклеина в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи людей пожилого и старческого возраста в норме, при болезнях Альцгеймера и Паркинсона.
  5. Оценить степень выраженности экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи людей пожилого и старческого возраста в норме, при болезнях Альцгеймера и Паркинсона.
  6. Оценить возможность использования периферических тканей (фибробласты кожи и буккальный эпителий) для диагностики болезней Альцгеймера и Паркинсона.

### **Степень разработанности темы исследования**

Основанием для разработки темы диссертационного исследования послужил пересмотр подходов к диагностике БА и умеренных когнитивных нарушений, предложенный в 2011 г. В основе этого положения лежит идея о том, что БА является нейродегенеративным, патофизиологическим процессом, который длится годами до появления первых клинических признаков деменции [Jack C.R. Jr. et al., 2010; Sperling RA. et al., 2011]. Стандартными маркерами для диагностики БА в СМЖ являются пептид А $\beta$ 42 и  $\tau$ -протеин. Специфичность и чувствительность диагностики БА при анализе этих биомаркеров составляет 85-90%. Однако этот метод не применим для рутинной клинической практики, так как сопряжен с развитием осложнений при выполнении инвазивной процедуры забора СМЖ. Существует ряд специфических маркеров, таких как  $\alpha$ -синуклеин, определение которых в крови или СМЖ позволяет сделать вывод о наличии/отсутствии БА [Poewe W. et al., 2017]. Однако для БА и БАП не существует стандартизированных и повсеместно применяемых диагностических тестов.

### **Научная новизна**

В работе впервые проведено сравнительное изучение экспрессии ключевых сигнальных молекул – маркеров БА и БАП (пептид А $\beta$ 42,  $\tau$ -протеин, протеинкиназа С, p16, p53,  $\alpha$ -синуклеин) в гиппокампе и черной субстанции головного мозга и периферических тканях (буккальный эпителий, фибробласты кожи). Такой подход позволил выяснить вклад указанных сигнальных молекул в старение центральной нервной системы в норме и при нейродегенеративных заболеваниях.

Впервые установлено, что экспрессия маркеров клеточного старения, вовлеченных в апоптозный сигнальный каскад (p16, p53), повышается при

естественном старении и развитии БА и БП в головном мозге и периферических тканях. У людей старше 60 лет с БА экспрессия пептида Аβ42 в гиппокампе, буккальном эпителии и фибробластах кожи возрастает по сравнению «с нормой». У людей старше 60 лет с БП экспрессия пептида Аβ42 в нейронах черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи повышается по сравнению «с нормой». Впервые показано, что при БА в гиппокампе экспрессия протеинкиназы С снижается почти в 10 раз у людей пожилого и старческого возраста. В буккальном эпителии при БА экспрессия протеинкиназы С снижается в 7,8 раза у людей пожилого возраста и в 8,2 раза - у людей старческого возраста. Впервые установлено, что экспрессия τ-протеина у лиц старше 60 лет с БА в гиппокампе и в буккальном эпителии возрастает по сравнению «с нормой». Экспрессия τ-протеина в черной субстанции и буккальном эпителии у людей пожилого и старческого возраста с БП возрастает по сравнению «с нормой». Впервые выявлено, что экспрессия α-синуклеина в гиппокампе и в буккальном эпителии у лиц старше 60 лет с БА повышается почти в 10 раз по сравнению с нормой. Экспрессия α-синуклеина в черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи у людей пожилого и старческого возраста с БП увеличивается по сравнению «с нормой».

Эти данные впервые позволили сравнить информативность экспрессии молекул – маркеров БА и БП в периферических тканях – буккальном эпителии и фибробластах кожи. На основании полученных данных можно предложить новый неинвазивный метод ранней диагностики БА и БП.

### **Практическая значимость**

Полученные результаты позволяют разработать алгоритм прижизненной диагностики и оценки эффективности терапии БА и БП у лиц старших возрастных групп. Выявленная в ходе исследований экспрессия ключевых молекул – маркеров БА (пептид Аβ42, τ-протеин, протеинкиназа-С), БП (α-синуклеин) и старения (p16, p53) может служить высокоинформативным неинвазивным и простым в исполнении методом диагностики и оценки эффективности лечения БА, БП и ускоренного старения организма.

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

1. Буккальный эпителий и фибробласты кожи могут использоваться в качестве малоинвазивного и высокоинформативного материала для диагностики темпа старения организма и нейродегенеративных заболеваний.
2. При переходе от пожилого к старческому возрасту повышается экспрессия маркеров апоптоза и клеточного старения (p16, p53) в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи. При нейродегенеративных заболеваниях этот процесс более выражен, чем «в норме». Выявлен сходный характер зависимости экспрессии маркера клеточного старения p16 между клетками гиппокампа и буккального эпителия у людей пожилого и старческого возраста «в норме» и при болезни Альцгеймера.

3. У людей пожилого и старческого возраста при болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона экспрессия пептида Аβ42 в клетках буккального эпителия (в большей степени) и фибробластах кожи (в меньшей степени) увеличивается, что отражает сходный процесс в головном мозге.
4. У людей пожилого и старческого возраста при болезни Альцгеймера экспрессия протеинкиназы С в гиппокампе и буккальном эпителии снижается, а в фибробластах кожи не изменяется. Экспрессия протеинкиназы С в головном мозге и периферических тканях пациентов с болезнью Паркинсона не зависит от возраста и наличия заболевания.
5. У людей пожилого и старческого возраста при болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона экспрессия τ-протеина в клетках буккального эпителия увеличивается, что отражает сходный процесс в головном мозге у этих пациентов.
6. У лиц пожилого и старческого возраста при болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона экспрессия α-синуклеина в периферических тканях (буккальный эпителий, фибробласты кожи) увеличивается, что отражает сходный процесс в головном мозге у этих пациентов.
7. Изучение экспрессии сигнальных молекул (пептида Аβ42, τ-протеина, протеинкиназы С, маркера клеточного старения p16, маркера апоптоза p53, α-синуклеина) в буккальном эпителии может использоваться для прижизненной неинвазивной диагностики болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона у лиц пожилого и старческого возраста.

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

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

#### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликованы 36 научных работ, в том числе 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК Миннауки и высшего образования РФ для опубликования материалов диссертационных исследований, 1 монография, 1 учебное пособие, 3 главы в монографиях и 16 тезисов докладов.

#### **Апробация и реализация диссертации**

Основные материалы диссертации доложены на международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2016, 2017, 2018); научно-практической конференции с международным участием «Проблемы возрастной патологии в Арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты» (Якутск, 2016); научной конференции «Биология и фундаментальная медицина в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2016); VI Национальном конгрессе геронтологов и гериатров Украины (Киев, 2016); XXI Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Санкт-Петербург, 2017); Научно-практической конференции «Инновацион-

ные российские технологии в геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2017); конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2018); XIII Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2018); всероссийской конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2018); XIV международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2019).

### **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 265 страницах, содержит 3 таблицы, иллюстрирован 118 рисунками. Список литературы содержит 331 источник, из них на русском языке – 32, на английском – 299.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Характеристика исследуемого материала**

В качестве объектов морфо-функционального исследования был выбран аутопсийный материал гиппокампа пациентов с БА пожилого (60-74 года, средний возраст  $69,3 \pm 3,4$  года) и старческого возраста (75-89 лет, средний возраст  $81,2 \pm 2,1$  года), биопсийный материал буккального эпителия и фибробласты кожи пациентов с БА пожилого (60-74 года, средний возраст  $65,8 \pm 2,6$  года) и старческого возраста (75-89 лет, средний возраст  $78,2 \pm 2,2$  года), аутопсийный материал черной субстанции пациентов с БП пожилого (60-74 года, средний возраст  $65,3 \pm 2,6$  года) и старческого возраста (75-89 лет, средний возраст  $83,2 \pm 2,3$  года), биопсийный материал буккального эпителия и фибробласты кожи пациентов с БП пожилого (60-74 года, средний возраст  $66,7 \pm 2,5$  года) и старческого возраста (75-89 лет, средний возраст  $81,3 \pm 2,4$  года). Аутопсийный и биопсийный материал был получен в больнице Святого Георгия (Санкт-Петербург, Россия).

Все пациенты были разделены на соответствующие возрастные группы в соответствии с международной классификацией ВОЗ. В качестве контроля изучали аутопсийный и биопсийный материал от пациентов пожилого и старческого возраста без патологии головного мозга (группа «норма»). Причиной смерти всех пациентов группы «норма», у которых исследовали аутопсийный материал, явилась сердечно-сосудистая патология (инфаркт миокарда). Биопсийный материал был получен от добровольцев, не имеющих патологии центральной нервной системы в анамнезе. Пациентам с БА была диагностирована начальная и умеренная степень деменции. Пациентам с БП диагноз был поставлен в соответствии с клиническими проявлениями заболевания, описывающими характерные нарушения координации движений. Пациенты, включенные в исследование, соответствовали международным критериям диагностики БА и БП: МКБ-10 (международная классификация болезней) и NINCDS/ADRDA. Оценка состояния пациентов с БА по шкале



MMSE составляла от 17 до 26 баллов. Все клинические данные по пациентам были получены из их историй болезни.

Все пациенты и добровольцы были разделены по возрасту методом рандомизации. Информированное согласие было дано всеми добровольцами, пациентами (или их родственниками) перед каждым исследованием.

Для исследования уровня экспрессии сигнальных молекул - A $\beta$ 42,  $\tau$ -протеина, протеинкиназы C,  $\alpha$ -синуклеина, p53 и p16 в гиппокампе, черной субстанции, буккальном эпителии и фибробластах кожи пациенты были разделены на группы, как показано в таблицах 1 и 2. Для количественной оценки экспрессии сигнальных молекул были выбраны методы иммуногисто- и иммуноцитохимии.

Таблица 1.

Схема проведения экспериментов по изучению экспрессии сигнальных молекул «в норме» и при болезни Альцгеймера

Объект исследования	Группы	Количество пациентов
Аутопсийный материал гиппокампа	1) пожилой возраст, «норма» 2) старческий возраст «норма» 3) пожилой возраст, БА 4) старческий возраст, БА	1) 30 человек (20 женщин, 10 мужчин) 2) 25 человек (16 женщин, 9 мужчин) 3) 36 человек (29 женщин, 7 мужчин) 4) 34 человека (30 женщин, 4 мужчин)
Буккальный эпителий	1) пожилой возраст, «норма» 2) старческий возраста, «норма» 3) пожилой возраст, БА 4) старческий возраст, БА	1) 20 человек (10 женщин, 10 – мужчин) 2) 23 человека (15 женщин, 8 мужчин) 3) 40 человек (32 женщины, 8 мужчин) 4) 39 человек (31 женщина, 8 мужчин)
Первичные культуры фибробластов кожи	1) пожилой возраст, женщина 67 лет, «норма» 2) старческий возраст, женщина 78 лет, «норма» 3) пожилой возраст, женщина 65 лет, БА 4) старческий возраст, женщина 76 лет, БА	

**Аутопсийный материал гиппокампа и черной субстанции.** Кусочки гиппокампа и черной субстанции объемом 1 см<sup>3</sup> фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (рН 7.2), обезвоживали с помощью автоматической станции проводки материала LeicaTP1020 и заливали в парафин.

Парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина («Sigma», США) для последующего иммуногистохимического исследования.

**Буккальный эпителий.** Забор буккального эпителия со слизистой оболочки щеки осуществляли не ранее, чем через 4 ч после приема пищи. Цитологические мазки готовили с применением метода жидкостной цитологии.

**Культивирование фибробластов кожи.** Соскоб эпидермиса (глубина и площадь соскоба составляли 1,7 мм и 1см<sup>2</sup> соответственно) производили в трех зонах лица - в лобной и околоушных областях. После получения кожу обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II, после чего механически отделяли эпидермис от дермы и помещали в раствор коллагеназы I типа в среде M199. Питательная среда состояла из среды M199, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 1,5% HEPES-буфера и смеси пенициллина и стрептомицина. Культивирование проводили до 3 пассажа, на котором клетки были рассеяны на планшет, после чего производили иммуноцитохимическое окрашивание. Для пермеабиллизации использовали 0,1% Тритон X-100 («Биолот», Россия), растворенный в PBS. Затем культуры клеток инкубировали в 1% бычьем сывороточном альбумине в течение 30 минут для блокировки неспецифического связывания. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 минут.

Исследование культур фибробластов кожи было проведено у ограниченного числа пациентов ввиду инвазивного характера процедуры забора соскоба кожи. Кроме того, при культивировании фибробластов кожи в течение 3х пассажей они теряют присущую им связь с микроокружением, что позволяет нивелировать возможные индивидуальные особенности фибробластов, присущие каждому испытуемому. От одной пациентки было получено по 24 образца культуры, что дало возможность оценивать экспрессию каждого маркера по 120 микрофотографиям. Таким образом, полученные выборки являются репрезентативными для статистического анализа.

Таблица 2.

Схема проведения экспериментов по изучению экспрессии сигнальных молекул в норме и при болезни Паркинсона

Объект исследования	Группы	Количество пациентов
Аутопсийный материал черной субстанции пациентов	1) пожилой возраст, «норма» 2) старческий возраст «норма» 3) пожилой возраст, БП 4) старческий возраст, БП	1) 25 человек (15 женщин, 10 мужчин) 2) 28 человек (22 женщин, 6 мужчин) 3) 38 человек (32 женщин, 6 мужчин) 4) 40 человек (19 женщин, 11 мужчин)
Буккальный эпителий	1) пожилой возраст, «норма» 2) старческий возраста, «норма» 3) пожилой возраст, БП 4) старческий возраст, БП	1) 22 человека (16 женщин, 6 мужчин) 2) 24 человека (20 женщин, 4 мужчин) 3) 20 человек (15 женщин, 5 мужчин)

		4) 19 человек (10 женщин, 9 мужчин)
Первичные культуры фибробластов кожи	1) пожилой возраст, женщина 66 лет, «норма» 2) старческий возраст, женщина 80 лет, «норма» 3) пожилой возраст, женщина 65 лет, БП 4) старческий возраст, женщина 78 лет, БП	

### **Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия**

Иммунофлуоресцентную конфокальную микроскопию проводили на клетках буккального эпителия, фибробластах кожи и препаратах гиппокампа и черной субстанции. Препараты обрабатывали первичными антителами к пептиду A $\beta$ 42 (1:100, Abcam),  $\tau$ -протеину (1:75, Dako), протеинкиназе C (1:150, Abcam), p53 (1:50, Dako), p16 (1:50, Dako),  $\alpha$ -синуклеину (1:100, Abcam). Анализ полученных образцов проводили на инвертированном конфокальном микроскопе "Olympus" Fluoview CM FV300-IX70.

Пептид A $\beta$ 42 является наиболее токсичным и склонным к агрегации фрагментом  $\beta$ -амилоида APP и накапливается в гиппокампе и других отделах головного мозга при БА [Armstrong R.A., 2014].  $\tau$ -протеин - белок, ассоциированный с микротрубочками. Гиперфосфорилированная форма  $\tau$ -протеина склонна к агрегации и накоплению в тканях головного мозга при БА [Kvetnoy I.M. et al., 2015]. Протеинкиназа C - фермент, осуществляющий фосфорилирование различных белков-мишеней в клетках и принимающий участие во внутриклеточной передаче сигнала, в том числе в тканях головного мозга [Khan T.K. et al., 2015]. Белки p53, p16 - транскрипционные факторы, регулирующие клеточный цикл и апоптоз, являются маркерами клеточного старения [Simpson J.E. et al., 2015; Micheli F. et al., 2016].  $\alpha$ -синуклеин - нейрональный белок пресинаптических терминалей, является основным компонентом телец Леви при БП [Пчелина С.Н., 2011].

### **Морфометрия**

Для оценки результатов иммуноцит- и иммуногистохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа "Olympus" Fluoview CM FV300-IX70, цифровой камеры Olympus, персонального компьютера на базе IntelPentium 5 и программного обеспечения «VideotestMorphology 5.2». В каждом случае анализировали 5 полей зрения. Для маркеров с цитоплазматическим окрашиванием площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади окрашенной цитоплазмы к общей площади клеток. Для маркеров с ядерным окрашиванием площадь экспрессии вычисляли как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными ядрами к общей площади ядер в поле зрения. В

условных единицах (у.е.) оценивали оптическую плотность экспрессии, отражающую количество исследуемого маркера, синтезируемого в одной клетке.

### **Статистический анализ данных**

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". Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала-Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью  $U$  критерия Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

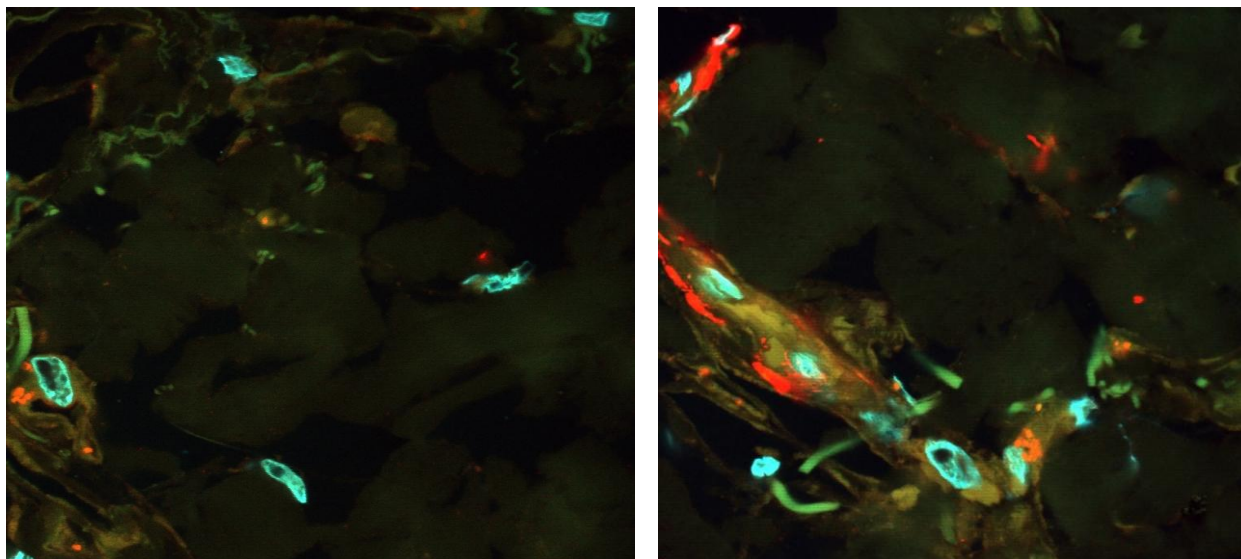
### **Экспрессия сигнальных молекул в гиппокампе лиц пожилого и старческого возраста «в норме» и при болезни Альцгеймера**

**Экспрессия пептида A $\beta$ 42.** Площадь экспрессии A $\beta$ 42 в гиппокампе людей пожилого и старческого возраста «в норме» достоверно не различалась. У пациентов с БА пожилого и старческого возраста площадь экспрессии пептида A $\beta$ 42 возрастала на два порядка по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (рис. 1, табл. 3). У людей пожилого и старческого возраста при БА оптическая плотность экспрессии пептида A $\beta$ 42 возрастала соответственно в 16,3 и 30,5 раза по сравнению с этим показателем «в норме» (табл. 4).

**Экспрессия  $\tau$ -протеина.** У людей старческого возраста «в норме» площадь экспрессии  $\tau$ -протеина была в 1,6 раза выше, чем этот показатель в пожилом возрасте. У пациентов с БА пожилого и старческого возраста площадь экспрессии  $\tau$ -протеина повышается в несколько десятков раз по сравнению с этим показателем «в норме» (табл. 3). Оптическая плотность экспрессии  $\tau$ -протеина у лиц без нейропатологии пожилого и старческого возраста достоверно не различалась. У пациентов с БА пожилого и старческого возраста оптическая плотность экспрессии  $\tau$ -протеина возрастает соответственно в 5,4 и 7,5 раза.

А

Б



**Рисунок 1.** Иммунофлуоресцентное окрашивание гиппокампа антителами к Аβ42. Конфокальная микроскопия, х100. Аβ42 - Alexa 567 – красно-оранжевая флуоресценция. Ядра докрашены Hoechst 33258 – голубая флуоресценция. А - женщина 64 года, «норма», Б - женщина 66 лет, БА.

Таблица 3.

*Площадь экспрессии сигнальных молекул в гиппокампе «в норме» и при болезни Альцгеймера*

Маркер	Площадь экспрессии, %			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БА	«норма»	БА
Аβ42	0,10±0,02	16,46±0,23*	0,12±0,03	20,14±0,31**
τ-протеин	0,14±0,02	9,22±0,18*	0,22±0,03 <sup>#</sup>	17,98±0,34**
РКС	4,37±0,20	0,59±0,07*	3,17±0,14 <sup>#</sup>	0,19±0,04**
p53	1,20±0,06	7,99±0,32*	1,16±0,09	23,14±0,25**
p16	1,45±0,11	18,75±0,25*	2,74±0,16 <sup>#</sup>	23,29±0,27**
α-синуклеин	0,12±0,02	0,98±0,15*	0,15±0,03	1,38±0,21** <sup>#</sup>

\* - p<0,05 - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* - p<0,05 - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

# - p<0,05 - по сравнению с людьми пожилого возраста с БА

Таблица 4.

*Оптическая плотность экспрессии сигнальных молекул в гиппокампе «в норме» и при болезни Альцгеймера*

Маркер	Оптическая плотность экспрессии, у.е.			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БА	«норма»	БА
Аβ42	0,03±0,004	0,49±0,07*	0,02±0,004	0,61±0,10**
τ-протеин	0,07±0,005	0,38±0,08*	0,06±0,005	0,45±0,10**
РКС	0,23±0,03	0,05±0,01*	0,25±0,04	0,04±0,01**
p53	0,17±0,03	0,67±0,11*	0,19±0,03	0,95±0,09**
p16	0,23±0,03	0,71±0,13*	0,23±0,03	0,71±0,13*
α-синуклеин	0,05±0,01	0,21±0,04*	0,06±0,01	0,30±0,05**

\* - p<0,05 - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

**Экспрессия протеинкиназы С.** У лиц без нейропатологии старческого возраста наблюдалось снижение площади экспрессии протеинкиназы С в гиппокампе на 27,5% по сравнению с этим показателем у лиц пожилого возраста. У людей пожилого и старческого возраста с БА площадь экспрессии протеинкиназы С снижалась соответственно в 7,4 и 16,7 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 3). Оптическая плотность экспрессии протеинкиназы С в гиппокампе людей пожилого и старческого возраста «в норме» не изменялась. Оптическая плотность экспрессии протеинкиназы С снижалась при БА у лиц пожилого возраста – в 4,6 раза и у лиц старческого возраста – в 6,3 раза (табл. 4).

**Экспрессия белка p53.** Площадь и оптическая плотность экспрессии p53 в гиппокампе людей пожилого и старческого возраста «в норме» не изменялась. При БА площадь экспрессии белка p53 у людей пожилого возраста увеличивалась в 6,7 раза, а у людей старческого возраста - в 19,9 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 3). При БА оптическая плотность экспрессии p53 у лиц пожилого и старческого возраста по сравнению с соответствующим показателем «в норме» повышалась соответственно в 3,9 и 5 раз (табл. 4).

**Экспрессия белка p16.** Площадь экспрессии p16 «в норме» у людей старческого возраста была почти в 2 раза выше по сравнению с этим показателем у лиц пожилого возраста. У пациентов с БА пожилого возраста площадь экспрессии транскрипционного фактора p16 возрастала в 13 раз, а у лиц старческого возраста с БА - в 8,5 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 3). При исследовании оптической плотности экспрессии белка p16 в гиппокампе у людей пожилого и старческого возраста у лиц без нейропатологии возрастная динамика не прослеживалась. При БА этот показатель у лиц пожилого и старческого возраста увеличивался в 3 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 4).

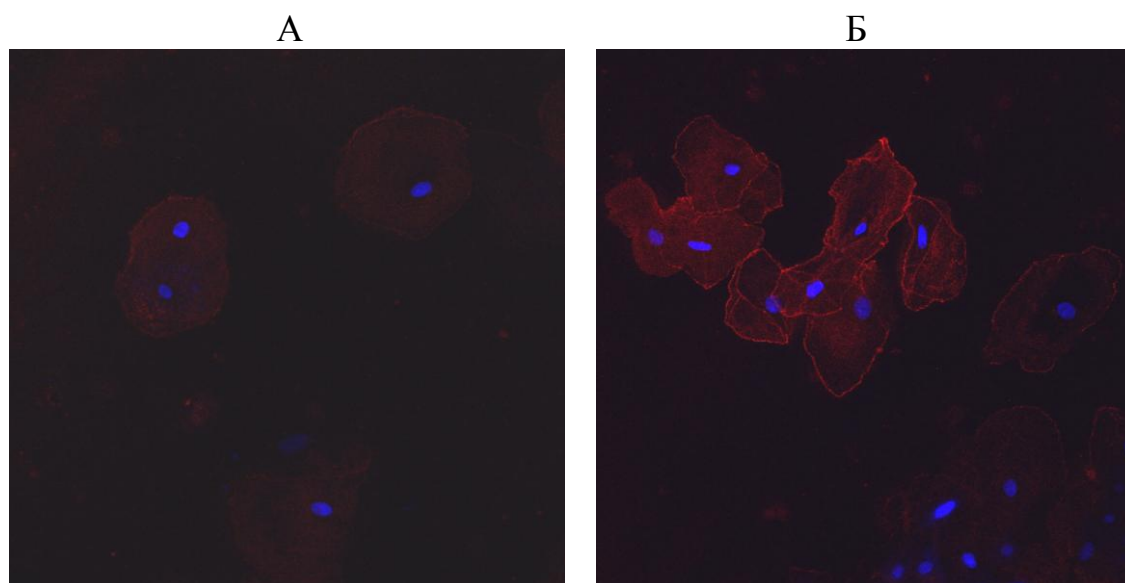
**Экспрессия  $\alpha$ -синуклеина.** Площадь и оптическая плотность экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в гиппокампе людей пожилого и старческого возраста «в норме» не различалась. У пациентов с БА пожилого и старческого возраста площадь экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в гиппокампе увеличивалась более, чем в 10 раз, по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 3). У людей пожилого возраста с БА оптическая плотность экспрессии  $\alpha$ -синуклеина возрастала в 4 раза, у пациентов старческого возраста с БА – в 5 раз по сравнению с этим показателем у лиц без нейропатологии (табл. 4).

### **Экспрессия сигнальных молекул в буккальном эпителии лиц пожилого и старческого возраста «в норме» и при болезни Альцгеймера**

**Экспрессия пептида A $\beta$ 42.** У людей пожилого и старческого возраста «в норме» экспрессия пептида A $\beta$ 42 достоверно не различалась (табл. 5). При БА у людей пожилого возраста площадь экспрессии пептида A $\beta$ 42 повышалась в 14,6 раза, а у людей старческого возраста - в 33 раза по

сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 5). Оптическая плотность экспрессии пептида Аβ42 в буккальном эпителии «в норме» с возрастном не изменялась. При БА у людей пожилого возраста данный параметр повышается в 16 раз, а у людей старческого возраста с БА - в 21 раз по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 6). При анализе экспрессии пептида Аβ42 в буккальном эпителии в норме и при БА были полученные данные, согласующиеся с экспрессией этого маркера в гиппокампе.

**Экспрессия τ-протеина.** У лиц без нейропатологии пожилого и старческого возраста экспрессия τ-протеина не различалась. При БА у людей пожилого возраста площадь экспрессии τ-протеина возрастала в 5,6 раза, а у людей старческого возраста - в 5,2 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (рис. 2, табл. 5). Оптическая плотность экспрессии τ-протеина в буккальном эпителии повышалась при БА в 4,5 раза у людей пожилого возраста, и в 5,5 раза - у лиц старческого возраста. Оптическая плотность экспрессии τ-протеина достоверно не различалась у лиц пожилого и старческого возраста без нейропатологии (табл. 6). Данные об экспрессии τ-протеина в буккальном эпителии являются полученными впервые, т.к. в литературе описания подобных исследований мы не обнаружили.



**Рисунок 2.** Иммунофлуоресцентное окрашивание буккального эпителиа антителами к τ-протеину. Конфокальная микроскопия, x200. τ-протеин - Alexa 567 – красная флуоресценция. Ядра докрашены Hoechst 33258 – голубая флуоресценция. А - женщина 78 лет, «норма», Б - женщина 65 лет, БА.

**Экспрессия протеинкиназы С.** «В норме» и при БА площадь экспрессии протеинкиназы С у лиц пожилого и старческого возраста не изменялась. У пациентов пожилого и старческого возраста с БА площадь экспрессии протеинкиназы С снижалась соответственно в 7,8 и 8,2 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 5). Наблюдается снижение в 4,8 раза оптической плотности экспрессии протеинкиназы С у людей пожилого возраста с БА и в 3,3 раза - у людей старческого возраста с

БА (табл. 6) по сравнению с соответствующим показателем «в норме». В одном из исследований была показана прямая корреляция между изменением экспрессии данного белка в эритроцитах крови и гиппокампе пациентов с БА [Janoshazi A. et al., 2006]. Полученные нами данные о снижении уровня протеинкиназы С при БА в гиппокампе и буккальном эпителии подтверждают гипотезу о том, что протеинкиназу С можно рассматривать в качестве потенциального маркера для прижизненной диагностики БА.

**Экспрессия белка p53.** «В норме» у лиц старческого возраста площадь экспрессии белка p53 возрастала на 24% по сравнению с этим показателем у лиц пожилого возраста. У пожилых людей с БА площадь экспрессии p53 возрастала в 2,6 раза, а у людей старческого возраста с БА - в 2,2 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 5). При анализе оптической плотности экспрессии сигнальной молекулы p53 в буккальном эпителии людей пожилого и старческого возраста статистически значимых различий между группами «норма» и «БА» выявлено не было (табл. 6). У пациентов с начальной стадией БА выявлено наличие повреждений ДНК в клетках буккального эпителия, что согласуется с полученными нами данными и дополняет их [François M. et al., 2014].

Таблица 5.

Площадь экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии «в норме» и при болезни Альцгеймера

Маркер	Площадь экспрессии, %			
	Пожилый возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БА	«норма»	БА
Aβ42	0,15±0,03	2,2±0,08*	0,13±0,04	4,3±0,11**
τ-протеин	0,05±0,01	0,28±0,04*	0,05±0,01	0,26±0,05**
PKC	0,47±0,09	0,06±0,02*	0,49±0,09	0,06±0,015**
p53	0,54±0,06	1,43±0,11*	0,71±0,06 <sup>#</sup>	1,58±0,16**
p16	0,39±0,05	3,97±0,34*	0,87±0,10 <sup>#</sup>	5,19±0,32**
α-синуклеин	0,08±0,02	0,70±0,11*	0,10±0,02	0,85±0,13**

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

# -  $p < 0,05$  по сравнению с людьми пожилого возраста с БА

Таблица 6.

Оптическая плотность экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии «в норме» и при болезни Альцгеймера

Маркер	Оптическая плотность экспрессии, у.е.			
	Пожилый возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БА	«норма»	БА
Aβ42	0,03±0,01	0,48±0,08*	0,03±0,01	0,63±0,15**
τ-протеин	0,04±0,01	0,18±0,03*	0,04±0,01	0,22±0,04**
PKC	0,29±0,05	0,06±0,02*	0,23±0,06	0,07±0,02**



p53	0,51±0,12	0,52±0,11	0,53±0,23	0,58±0,09
p16	0,36±0,09	0,99±0,14*	0,41±0,11	0,80±0,13**
α-синуклеин	0,15±0,04	0,31±0,09*	0,17±0,04	0,31±0,11**

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

**Экспрессия белка p16.** «В норме» у лиц старческого возраста площадь экспрессии p16 была 2 раза выше по сравнению с этим показателем у лиц пожилого возраста (табл. 5). При БА площадь экспрессии p16 у пожилых людей возрастала в 10 раз, а у лиц старческого возраста - в 6 раз по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 5). При БА наблюдается увеличение оптической плотности экспрессии p16: в 2,8 раза – у лиц пожилого возраста и в 2 раза - у людей старческого возраста по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 6). Эти данные согласуются с результатами, полученными в ходе анализа экспрессии p16 в клетках гиппокампа.

**Экспрессия α-синуклеина.** Площадь и оптическая плотность экспрессии α-синуклеина в буккальном эпителии людей пожилого и старческого возраста без нейропатологии достоверно не различалась. У пациентов с БА пожилого и старческого возраста площадь и оптическая плотность экспрессии α-синуклеина в буккальном эпителии возрастала в 2-9 раз (табл. 5, 6).

### Экспрессия сигнальных молекул в фибробластах кожи лиц пожилого и старческого возраста «в норме» и при болезни Альцгеймера

**Экспрессия пептида Aβ42.** «В норме» у людей пожилого и старческого возраста в фибробластах кожи пептид Aβ42 практически не экспрессировался (табл. 7, 8). У людей с БА пожилого возраста площадь экспрессии пептида Aβ42 в фибробластах кожи возрастала в 4 раза, а у лиц старческого возраста с БА - в 3,3 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 7). При БА у людей пожилого и старческого возраста оптическая плотность экспрессии пептида Aβ42 увеличивалась в 10 раз по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 8).

Таблица 7.

Площадь экспрессии сигнальных молекул в фибробластах кожи в норме и при болезни Альцгеймера

Маркер	Площадь экспрессии, %			
	Пожилый возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БА	«норма»	БА
Aβ42	0,03±0,005	0,12±0,03*	0,03±0,005	0,10±0,03**
τ-протеин	0,05±0,01	0,07 ±0,02	0,04±0,01	0,09±0,03
PKC	0,3±0,06	0,22±0,06	0,31±0,09	0,19±0,06
p53	0,41±0,12	2,13±0,21	0,50±0,07	2,78±0,22
p16	0,64±0,10	2,94±0,12*	0,85±0,15	3,14±0,19**
α-синуклеин	0,06±0,01	0,10±0,03	0,05±0,01	0,09±0,02

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

Таблица 8.

Оптическая плотность экспрессии сигнальных молекул в фибробластах кожи «в норме» и при болезни Альцгеймера

Маркер	Оптическая плотность экспрессии, у.е.			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БА	«норма»	БА
A $\beta$ 42	0,03 $\pm$ 0,005	0,30 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,005	0,33 $\pm$ 0,07
$\tau$ -протеин	0,035 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,02*	0,04 $\pm$ 0,005	0,65 $\pm$ 0,02**
PKC	0,26 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,09	0,15 $\pm$ 0,03
p53	0,35 $\pm$ 0,15	0,65 $\pm$ 0,16*	0,40 $\pm$ 0,10	0,88 $\pm$ 0,12**
p16	0,20 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,12*	0,47 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,10**
$\alpha$ -синуклеин	0,10 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,04

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

**Экспрессия  $\tau$ -протеина.** Площадь экспрессии  $\tau$ -протеина в фибробластах кожи статистически значимо не различалась ни между группами «норма» и «БА», ни между возрастными группами (табл. 7). Оптическая плотность экспрессии  $\tau$ -протеина в фибробластах кожи повышалась у пациентов с БА по сравнению с этим показателем у лиц без нейропатологии: в 17 раз у людей пожилого возраста и в 16 раз - у лиц старческого возраста (табл. 8).

**Экспрессия протеинкиназы С.** Площадь и оптическая плотность экспрессии протеинкиназы С в фибробластах кожи у людей пожилого и старческого возраста не изменялась ни «в норме», ни при БА (табл. 7, 8). В 2015 г. в журнале «Journal of Alzheimer disease» была опубликована статья, в которой продемонстрировано снижение количества  $\epsilon$ -изоформы протеинкиназы С в фибробластах кожи и в гиппокампе пациентов с БА [Khan T.K., et al., 2015]. В нашем исследовании взаимосвязь между снижением экспрессии протеинкиназы С в гиппокампе и её количеством в фибробластах кожи не прослеживалась. Вероятно, изученная в статье зарубежных коллег изоформа протеинкиназы С более специфична для фибробластов и снижение экспрессии именно этой изоформы белка наблюдается при БА в данном типе клеток. Этим можно объяснить разницу в полученных результатах. Возможно, также, что при культивировании фиброласты кожи изменяли свои свойства, что сказалось на экспрессии различных форм протеинкиназы С.

**Экспрессия белка p53.** У людей пожилого и старческого возраста «в норме» площадь экспрессии белка p53 достоверно не изменялась. При БА площадь экспрессии p53 возрастала в 5,2 раза у пожилых людей, а у людей старческого возраста - в 5,5 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 7). Оптическая плотность экспрессии p53 в фибробластах кожи у людей пожилого возраста при БА не изменялась по сравнению с соответствующим показателем «в норме». У людей старческого возраста оптическая плотность экспрессии p53 при БА повышалась в 2,1 раза по сравне-

нию с соответствующим значением «в норме» (табл. 8). Данные об экспрессии белка p53 в фибробластах кожи в норме и при БА согласуются с результатами, полученными при анализе экспрессии p53 в клетках гиппокампа, и подтверждают предположение о том, что при БА возрастает количество клеток, вступающих в апоптоз.

**Экспрессия белка p16.** При БА площадь экспрессии белка p16 у лиц пожилого и старческого возраста повышалась соответственно в 4,9 раза и 3,7 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 7). Оптическая плотность экспрессии p16 в фибробластах кожи при БА повышалась у людей пожилого возраста в 3,8 раза и у лиц старческого возраста - в 2 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме». Увеличение оптической плотности экспрессии p16 в 2 раза с возрастом было установлено только для группы «норма» (табл. 8). Экспрессия маркера клеточного старения p16 в фибробластах кожи лишь частично совпадает с экспрессией данного биомаркера в гиппокампе у людей разного возраста. В частности, наблюдаются различия между группами «норма» и «БА», однако отсутствует возрастная динамика, характерная для данного биомаркера.

**Экспрессия  $\alpha$ -синуклеина.** При исследовании площади и оптической плотности экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в фибробластах кожи людей пожилого и старческого возраста «в норме» и при БА значимых различий не обнаружено (табл. 7,8).

Исследование экспрессии сигнальных молекул-маркеров в буккальном эпителии и фибробластах кожи у людей разного возраста при БА проведено впервые. При этом продемонстрировано, что тенденция экспрессии исследованных маркеров в буккальном эпителии полностью повторяет тенденцию экспрессии в гиппокампе. Наблюдаются значимые различия между экспрессией пептида A $\beta$ 42,  $\tau$ -протеина, протеинкиназы C, p53, p16 и  $\alpha$ -синуклеина в гиппокампе пациентов с БА и людьми без нейродегенеративных заболеваний пожилого и старческого возраста. В фибробластах кожи аналогичная тенденция сохранялась только для пептида A $\beta$ 42, белков p53 и p16. Это позволяет сделать вывод об универсальности буккального эпителия как материала для ранней неинвазивной диагностики БА.

### **Экспрессия сигнальных молекул в черной субстанции головного мозга лиц пожилого и старческого возраста «в норме» и при болезни Паркинсона**

**Экспрессия пептида A $\beta$ 42.** При исследовании площади экспрессии A $\beta$ 42 в черной субстанции людей пожилого и старческого возраста «в норме» различий не обнаружено. У пациентов с БП пожилого и старческого возраста площадь экспрессии пептида A $\beta$ 42 возрастает более, чем в 10 раз по сравнению с соответствующей возрастной «нормой» (табл. 9). У людей пожилого возраста с БП оптическая плотность экспрессии A $\beta$ 42 возросла в 7,5 раза, а у лиц старческого возраста – в 3,3 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 10).

**Экспрессия  $\tau$ -протеина.** У людей пожилого и старческого возраста «в норме» площадь экспрессии  $\tau$ -протеина достоверно не различалась. У пациентов с БП пожилого и старческого возраста экспрессия  $\tau$ -протеина повышается в десятки раз по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 9). Уровень оптической плотности экспрессии  $\tau$ -протеина не изменялся в обеих возрастных группах «в норме» и при БП (табл. 10).

**Экспрессия протеинкиназы С.** Площадь экспрессии протеинкиназы С в черной субстанции головного мозга не зависела от наличия БП. Площадь экспрессии протеинкиназы С у пациентов старческого возраста «в норме» была на 29% выше этого показателя у лиц пожилого возраста. Площадь экспрессии протеинкиназы С у пациентов старческого возраста с БП была на 22% больше этого значения у лиц пожилого возраста (табл. 9). При исследовании оптической плотности экспрессии протеинкиназы С в черной субстанции головного мозга не было выявлено достоверных различий между возрастными группами и группами «норма» и «БП» (табл. 10).

Таблица 9.

Площадь экспрессии сигнальных молекул в черной субстанции «в норме» и при болезни Паркинсона

Маркер	Площадь экспрессии, %			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БП	«норма»	БП
A $\beta$ 42	0,11±0,02	3,15±0,20*	0,12±0,02	3,79±0,21**#
$\tau$ -протеин	0,10±0,02	1,17±0,05*	0,15±0,03	1,97±0,15**#
PKC	3,12±0,15	3,19±0,18	4,05±0,12*	3,90±0,21#
p53	0,90±0,17	3,53±0,20*	1,15±0,20*	5,17±0,31**#
p16	0,75±0,12	3,25±0,15*	2,33±0,20*	7,54±0,31**#
$\alpha$ -синуклеин	0,35±0,10	8,10±1,05*	0,37±0,11*	9,32±1,10**#

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

Таблица 10.

Оптическая плотность экспрессии сигнальных молекул в черной субстанции «в норме» и при болезни Паркинсона

Маркер	Оптическая плотность экспрессии, у.е.			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БП	«норма»	БП
A $\beta$ 42	0,04±0,005	0,30±0,04*	0,10±0,001*	0,33±0,07**
$\tau$ -протеин	0,05±0,01	0,07±0,02	0,06±0,02	0,08±0,02
PKC	0,05±0,01	0,04±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01
p53	0,20±0,04	0,32±0,07*	0,21±0,05	0,30±0,05
p16	0,15±0,03	0,55±0,10*	1,12±0,10*	6,39±0,23**#
$\alpha$ -синуклеин	0,07±0,02	0,30±0,04*	0,08±0,02	0,54±0,09**#

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению с «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

# -  $p < 0,05$  по сравнению с людьми пожилого возраста с БП

**Экспрессия белка p53.** При исследовании площади и оптической плотности экспрессии белка p53 в черной субстанции людей пожилого и старческого возраста «в норме» не было обнаружено статистически значимых различий. При БП площадь экспрессии p53 у людей пожилого и старческого возраста увеличивалась по сравнению с соответствующим показателем «в норме» в 3,9 и 4,5 раза (табл. 9). При БП оптическая плотность экспрессии p53 у лиц пожилого возраста увеличивалась по сравнению с соответствующим значением «в норме» в 1,6 раза. У лиц старческого возраста этот показатель статистически значимо не различался в группах «норма» и «БП» (табл. 10).

**Экспрессия белка p16.** Площадь экспрессии p16 в черной субстанции «в норме» у людей старческого возраста повышалась в 3,1 раза по сравнению с этим показателем у лиц пожилого возраста (табл. 9). Оптическая плотность экспрессии p16 в черной субстанции у людей старческого возраста «в норме» была в 7,5 раза выше, чем соответствующее значение у лиц пожилого возраста. Оптическая плотность экспрессии p16 в черной субстанции у людей пожилого и старческого возраста с БП возрастала соответственно в 3,7 и в 5,7 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 10). Исследование динамики p16 в черной субстанции головного мозга пациентов с БП проведено нами впервые.

**Экспрессия  $\alpha$ -синуклеина.** Площадь экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в черной субстанции людей пожилого и старческого возраста у лиц без нейропатологии не различалась. У пациентов с БП площадь экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в черной субстанции возрастает по сравнению с соответствующим показателем «в норме»: у пожилых людей – в 23 раза и у лиц старческого возраста – в 25 раз (табл. 9). «В норме» оптическая плотность экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в черной субстанции лиц пожилого и старческого возраста не различалась. У пациентов пожилого и старческого возраста с БП этот показатель возрастал, соответственно в 4,3 и 6,8 раза по сравнению со значением «в норме» (табл. 10).

**Экспрессия сигнальных молекул в буккальном эпителии  
лиц пожилого и старческого возраста «в норме»  
и при болезни Паркинсона**

**Экспрессия A $\beta$ 42.** У людей пожилого и старческого возраста «в норме» площадь и оптическая плотность экспрессии пептида A $\beta$ 42 в буккальном эпителии достоверно не различалась. При БП у людей пожилого возраста площадь экспрессии пептида A $\beta$ 42 повышалась в 6,1 раза, а у людей старческого возраста – в 10 раз по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 11). При БП у людей пожилого возраста данный параметр повышается в 6 раз, а у людей старческого возраста – в 3 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 12). Выявлено соответствие уровня экспрессии пептида A $\beta$ 42 в буккальном эпителии и черной

субстанции головного мозга пациентов с БП и лиц без нейропатологии пожилого и старческого возраста.

**Экспрессия  $\tau$ -протеина.** «В норме» площадь и оптическая плотность экспрессии  $\tau$ -протеина у людей пожилого и старческого возраста не различалась. При БП у людей пожилого и старческого возраста площадь экспрессии  $\tau$ -протеина возрастала соответственно в 5 и 6,3 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 11). Оптическая плотность экспрессии  $\tau$ -протеина в буккальном эпителии при БП у людей пожилого и старческого возраста была соответственно в 3 и 4 раза выше по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 12). Повышение экспрессии этого маркера в буккальном эпителии пациентов с БП по сравнению «с нормой» совпадает с данными, полученными по экспрессии  $\tau$ -протеина в черной субстанции головного мозга.

Таблица 11.

Площадь экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии «в норме» и при болезни Паркинсона

Маркер	Площадь экспрессии, %			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БП	«норма»	БП
A $\beta$ 42	0,09 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,10*	0,09 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,15**#
$\tau$ -протеин	0,07 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,10*	0,10 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,11**
PKC	0,35 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,10	0,37 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,11
p53	0,71 $\pm$ 0,23	1,90 $\pm$ 0,30*	0,85 $\pm$ 0,20	2,15 $\pm$ 0,33**#
p16	0,43 $\pm$ 0,15	0,59 $\pm$ 0,12	0,55 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,14
$\alpha$ -синуклеин	0,12 $\pm$ 0,02	1,95 $\pm$ 0,21*	0,14 $\pm$ 0,03	1,70 $\pm$ 0,20**

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

# -  $p < 0,05$  по сравнению с людьми пожилого возраста с БП

Таблица 12.

Оптическая плотность экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии «в норме» и при болезни Паркинсона

Маркер	Оптическая плотность экспрессии, у.е.			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БП	«норма»	БП
A $\beta$ 42	0,05 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,08*	0,04 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,11**
$\tau$ -протеин	0,04 $\pm$ 0,005	0,15 $\pm$ 0,01*	0,06 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02**#
PKC	0,09 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02
p53	0,51 $\pm$ 0,12	0,48 $\pm$ 0,15	0,50 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,15
p16	0,40 $\pm$ 0,11	0,45 $\pm$ 0,14	0,42 $\pm$ 0,12	0,50 $\pm$ 0,15
$\alpha$ -синуклеин	0,20 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,09*	0,22 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,06**#

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

# -  $p < 0,05$  по сравнению с людьми пожилого возраста с БП

**Экспрессия протеинкиназы С.** Площадь и оптическая плотность экспрессии протеинкиназы С не различалась ни у пациентов с БП, ни у лиц без нейропатологии и не зависели от возраста пациентов (табл. 11, 12).

**Экспрессия белка p53.** У людей пожилого и старческого возраста без нейропатологии площадь экспрессии p53 достоверно не различалась. У пожилых людей с БП площадь экспрессии p53 возрастала в 2,7 раза, а у лиц старческого возраста с БП – в 2 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 11). Оптическая плотность экспрессии p53 в буккальном эпителии людей пожилого и старческого возраста в группах «норма» и «БП» статистически значимо не различалась (табл. 12).

**Экспрессия белка p16.** Площадь и оптическая плотность экспрессии маркера старения и апоптоза p16 в буккальном эпителии «в норме» и при БП, а также в разных возрастных группах не различалась (табл. 11, 12).

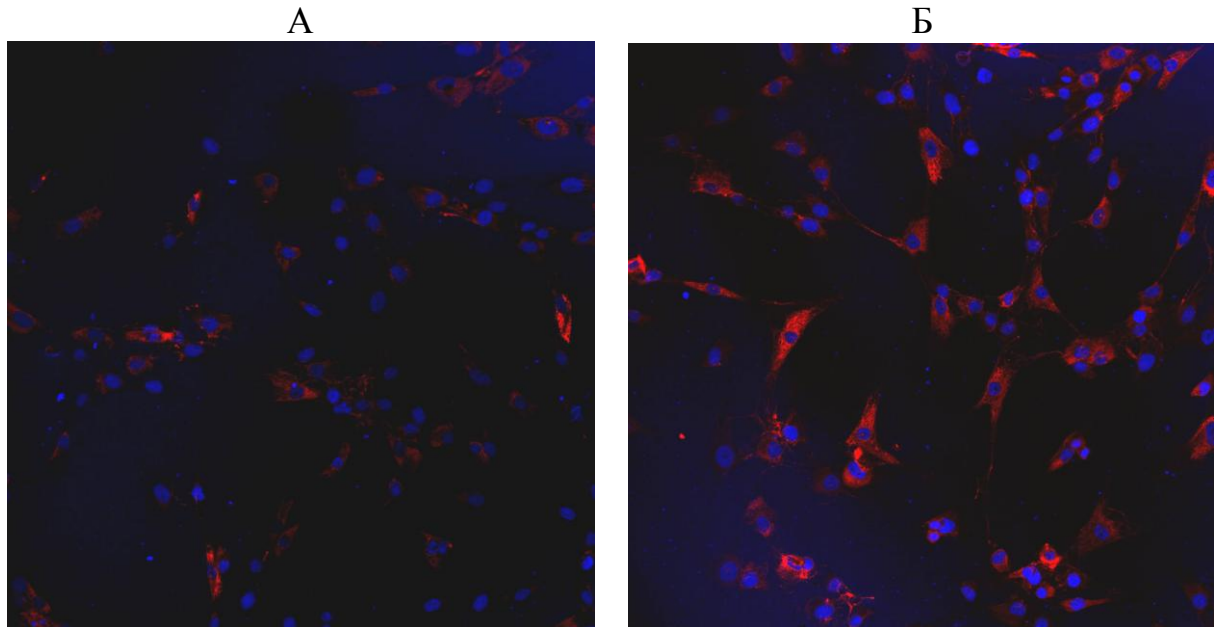
**Экспрессия  $\alpha$ -синуклеина.** Площадь и оптическая плотность экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в буккальном эпителии людей пожилого и старческого возраста без нейропатологии достоверно не различалась (табл. 11, 12). У пациентов с БП площадь экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в буккальном эпителии возрастала по сравнению с этим показателем «в норме»: в 16,3 раза у лиц пожилого возраста и в 12,1 раза у людей старческого возраста (табл. 11). У людей пожилого возраста с БП оптическая плотность экспрессии  $\alpha$ -синуклеина возрастала в 2,3 раза, у пациентов старческого возраста с БП в 2,9 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 12). Выявленное повышение экспрессии данного маркера при БП в буккальном эпителии совпадает с данными, полученными для нейронов черной субстанции головного мозга.

### **Экспрессия сигнальных молекул в фибробластах кожи лиц пожилого и старческого возраста «в норме» и при болезни Паркинсона**

**Экспрессия пептида A $\beta$ 42.** «В норме» у людей пожилого и старческого возраста площадь экспрессии пептида A $\beta$ 42 в фибробластах кожи достоверно не различалась. У людей с БП пожилого возраста площадь экспрессии пептида A $\beta$ 42 в фибробластах кожи возрастала в 4,7 раза, а у людей старческого возраста с БП – в 3,75 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (рис. 3, табл. 13). Оптическая плотность экспрессии пептида A $\beta$ 42 «в норме» не различалась в исследуемых возрастных группах. При БП у людей пожилого возраста оптическая плотность экспрессии пептида A $\beta$ 42 возрастала в 4 раза, а у лиц старческого возраста в 4,4 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 14). При анализе экспрессии пептида A $\beta$ 42 «в норме» и при БП в фибробластах кожи был полученный результат, согласующийся с данными об экспрессии пептида A $\beta$ 42 в черной субстанции.

**Экспрессия  $\tau$ -протеина и протеинкиназы С.** При исследовании площади и оптической плотности экспрессии  $\tau$ -протеина и протеинкиназы С в фибробластах кожи статистически значимых различий между группами

«норма» и «БП» обнаружено не было. Возрастное изменение площади и оптической плотности экспрессии этих сигнальных молекул также не прослеживалось (табл. 13, 14). В литературе мы обнаружили исследование, посвященное изучению фосфорилированной формы  $\tau$ -протеина в клетках кожи при помощи метода иммуногистохимии. Авторами получены данные, свидетельствующие о повышении фосфорилированной формы  $\tau$ -протеина в коже пациентов с БП [Rodríguez-Leyva I. et al., 2016]. Вероятно, расхождения между этими данными и полученными нами результатами обусловлены тем, что в данной работе мы изучали не фосфорилированную форму  $\tau$ -протеина.



**Рисунок 3.** Иммунофлуоресцентное окрашивание фибробластов кожи антителами к  $A\beta 42$ . Конфокальная микроскопия,  $\times 100$ .  $A\beta 42$  - Alexa 567 – красная флуоресценция. Ядра докрашены Noest 33258 – голубая флуоресценция. А – женщина 74 года, «норма», Б - женщина 73 года, БП.

**Экспрессия белка p53.** Площадь и оптическая плотность экспрессии проапоптотического протеина p53 в фибробластах кожи у людей пожилого и старческого возраста «в норме» не различалась. При БП площадь экспрессии p53 в фибробластах возрастала в 4,2 раза, а у лиц старческого возраста - в 4 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 13). При БП оптическая плотность экспрессии p53 в фибробластах кожи у людей пожилого возраста увеличивалась в 2,25 раза, а у людей старческого возраста - в 3,75 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 14).



Таблица 13.

Площадь экспрессии сигнальных молекул в фибробластах кожи  
«в норме» и при болезни Паркинсона

Маркер	Площадь экспрессии, %			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БП	«норма»	БП
Aβ42	0,03±0,005	0,14±0,02*	0,04±0,01	0,15±0,03**
τ-протеин	0,05±0,01	0,07±0,02	0,05±0,01	0,08±0,02
PKC	0,003±0,005	0,04±0,01	0,04±0,01	0,035±0,01
p53	0,51±0,11	2,15±0,20*	0,50±0,12	2,05±0,21**
p16	0,61±0,09	1,55±0,21*	0,72±0,13	1,97±0,22**#
α-синуклеин	0,12±0,03	1,15±0,10*	0,10±0,02	1,48±0,11**#

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

# -  $p < 0,05$  по сравнению с людьми пожилого возраста с БП

Таблица 14.

Оптическая плотность экспрессии сигнальных молекул в фибробластах кожи  
«в норме» и при болезни Паркинсона

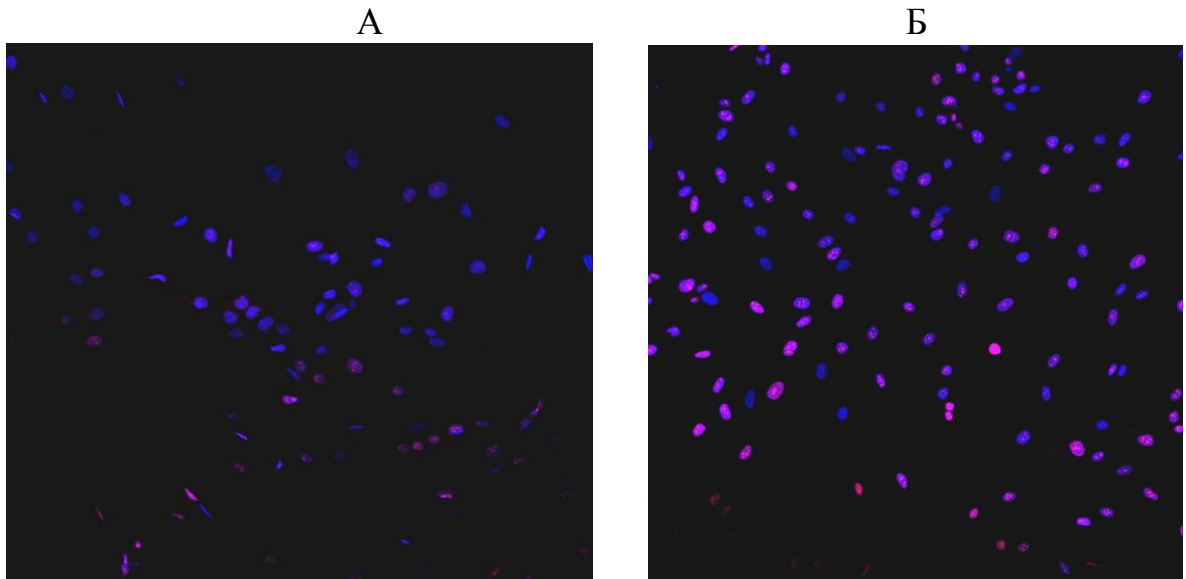
Маркер	Оптическая плотность экспрессии, у.е.			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	«норма»	БП	«норма»	БП
Aβ42	0,05±0,01	0,20±0,02*	0,05±0,01	0,22±0,03**
τ-протеин	0,05±0,01	0,06±0,02	0,06±0,02	0,08±0,02
PKC	0,03±0,01	0,04±0,01	0,035±0,01	0,06±0,02
p53	0,04±0,01	0,09±0,02*	0,04±0,01	0,15±0,03**#
p16	0,20±0,03	0,60±0,15*	0,35±0,06*	0,61±0,09**
α-синуклеин	0,10±0,02	0,33±0,04*	0,12±0,03	0,51±0,10**#

\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей пожилого возраста

\*\* -  $p < 0,05$  - по сравнению «с нормой» у людей старческого возраста

# -  $p < 0,05$  по сравнению с людьми пожилого возраста с БП

**Экспрессия белка p16.** Площадь экспрессии маркера клеточного старения и апоптоза p16 в фибробластах кожи у пожилых людей и лиц старческого возраста «в норме» не различалась. При БП площадь экспрессии p16 в фибробластах у пожилых людей и лиц старческого возраста повышалась соответственно в 2,5 и 2,7 раза по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (рис. 4, табл. 13.). При БП оптическая плотность экспрессии p16 в фибробластах кожи у людей пожилого возраста повышалась в 3 раза, а у лиц старческого возраста в 2 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 14).



**Рисунок 4.** Иммунофлуоресцентное окрашивание фибробластов кожи антителами к p16. Конфокальная микроскопия, x100. P16- Alexa 567 – розовая флуоресценция. Ядра докрашены Hoest 33258 – голубая флуоресценция. А - женщина 68 лет, «норма», Б - женщина 68 лет, БП.

**Экспрессия  $\alpha$ -синуклеина.** При исследовании площади и оптической плотности экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в фибробластах кожи людей пожилого и старческого возраста «в норме» достоверных различий не выявлено (табл. 13, 14). У пациентов с БП пожилого и старческого возраста площадь экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в фибробластах кожи возрастала более, чем в 10 раз по сравнению с соответствующим показателем «в норме» (табл. 13). У людей пожилого возраста с БП оптическая плотность экспрессии  $\alpha$ -синуклеина возрастала в 3,3 раза, а у пациентов старческого возраста с БП в 4,25 раза по сравнению с соответствующим значением «в норме» (табл. 14).

Исследование экспрессии вышеперечисленных сигнальных молекул-маркеров в буккальном эпителии и фибробластах кожи у людей разного возраста с БП проведено впервые. В буккальном эпителии экспрессия пептида A $\beta$ 42,  $\tau$ -протеина, p53,  $\alpha$ -синуклеина имела такую же тенденцию к возрастанию при БП по сравнению с соответствующими показателями «в норме», как и в клетках черной субстанции головного мозга. В фибробластах кожи пациентов с БП пожилого и старческого возраста повышалась экспрессия пептида A $\beta$ 42,  $\alpha$ -синуклеина и маркеров клеточного старения p16 и p53.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день в медицине отсутствует простой неинвазивный метод ранней диагностики БА и БП, позволяющий выявить начало развития

заболеваний до проявления первых симптомов когнитивных нарушений [Пальцев М.А. и др., 2016]. Поиск нового метода неинвазивной диагностики БА и БП может включать в себя 2 задачи: выявление наиболее информативных сигнальных молекул, вовлеченных в патогенез БА и БП, и поиск легко доступных периферических тканей, которые могли бы использоваться для диагностических тестов.

Необходимость в разработке неинвазивных методов диагностики нейродегенеративных заболеваний может быть достигнута при исследовании клеток буккального эпителия человека в качестве объекта для изучения биомаркеров БА и БП [Kvetnoy I.M. et al., 2015; François M. et al., 2016]. Существуют данные, согласно которым фибробласты кожи также можно рассматривать как удобный способ прижизненной ранней диагностики БА [Khan T.K. et al., 2015; Mukhamedyarov M.A. et al., 2016; Pérez M.J. et al., 2017], однако данных по диагностике БП при помощи фибробластов в литературе нет. Развитие БА и БП сопровождается изменением синтеза сигнальных молекул (пептида Аβ42, τ-протеина, α-синуклеина и др.) не только в головном мозге, но и в других тканях - в лимфоцитах крови и СМЖ. Клетки буккального эпителия легко доступны (соскоб со слизистой поверхности щеки) и при использовании метода иммуноцитохимии могут указывать на ускоренное старение организма или возникновение различной соматической патологии. Полученные нами данные демонстрируют увеличение экспрессии маркеров клеточного старения p16 и p53 в клетках гиппокампа, буккального эпителия, фибробластов кожи при БА, и в клетках ЧС и фибробластов кожи при БП. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о повышении экспрессии маркера клеточного старения p53 при БА и БП в тканях головного мозга [Duplan E. et al., 2016], что согласуется с полученными нами результатами. Изучение p53 и p16 в периферических тканях проведено впервые. Обнаружено наличие корреляции между экспрессией данных маркеров в головном мозге, буккальном эпителии и фибробластах кожи при БА и БП.

Полученные в нашем исследовании данные об изменении интенсивности экспрессии ассоциированных с БА и БП сигнальных молекул (пептид Аβ42, τ-протеин, протеинкиназа С, α-синуклеин, маркеры клеточного старения и апоптоза p16 и p53) в буккальном эпителии и фибробластах кожи позволяют сделать вывод о целесообразности использования указанных периферических тканей для ранней диагностики БА и БП. Особенно перспективным в этом плане представляется изучение буккального эпителия, поскольку для проведения диагностических процедур достаточно произвести иммуноцитохимическое окрашивание на указанные сигнальные молекулы - биомаркеры БА и БП без необходимости культивирования клеток. Более этого, в клетках буккального эпителия прослеживалась более сильная корреляция с клетками гиппокампа и черной субстанции в динамике экспрессии основных сигнальных молекул БА и БП (пептид Аβ42, τ-протеин, протеинкиназа С, α-синуклеин).

Таким образом, буккальный эпителий представляет собой объект для ранней прижизненной диагностики БА и БП. В качестве молекулярных мар-

керов диагностики БА и БП в буккальном эпителии можно использовать пептид Аβ42, τ-протеин, протеинкиназу С, p16, p53 и α-синуклеин.

### ВЫВОДЫ

1. С возрастом экспрессия маркеров апоптоза и клеточного старения (p16, p53) в гиппокампе и черной субстанции головного мозга, буккальном эпителии и фибробластах кожи пациентов с БА, БП увеличивается. «В норме» это повышение выражено не значительно, а при нейродегенеративных заболеваниях экспрессия указанных маркеров может возрастать в десятки раз. Для БА эта зависимость наиболее выражена для экспрессии транскрипционного фактора p16 в клетках гиппокампа и буккального эпителия, для БП - в экспрессии белка p53 в нейронах черной субстанции и буккальном эпителии и p16 - в клетках черной субстанции и фибробластах кожи.
2. У людей пожилого и старческого возраста с БА уровень экспрессии пептида Аβ42 в гиппокампе повышается в 17-29 раз, в буккальном эпителии - в 15-33 раза, в фибробластах кожи - в 4-5 раз по сравнению «с нормой». У людей пожилого и старческого возраста с БП экспрессия пептида Аβ42 в нейронах черной субстанции увеличивается в 29-32 раза, в буккальном эпителии - в 6-10 раз, в фибробластах кожи - в 4-5 раз по сравнению «с нормой». Таким образом, характер экспрессии пептида Аβ42 в гиппокампе и периферических тканях (буккальный эпителий, фибробласты кожи) коррелирует с наличием БА и БП у людей старших возрастных групп.
3. При БА в гиппокампе экспрессия протеинкиназы С снижается в 7,4 раза у людей пожилого возраста и в 16,7 раза - у людей старческого возраста. В буккальном эпителии при БА экспрессия протеинкиназы С снижается в 7,8 раза у людей пожилого возраста и в 8,2 раза - у людей старческого возраста. В фибробластах кожи лиц пожилого и старческого возраста экспрессия протеинкиназы С «в норме» и при БА не различается. При БП экспрессия протеинкиназы С в черной субстанции и фибробластах кожи снижается при переходе от пожилого возраста к старческому, независимо от наличия заболевания.
4. Экспрессия τ-протеина у людей пожилого и старческого возраста с БА в гиппокампе возрастает в 66-82 раза, в буккальном эпителии - в 5-6 раз по сравнению с нормой. Экспрессия τ-протеина в черной субстанции у людей пожилого и старческого возраста с БП возрастает в 12-13 раз, в буккальном эпителии - в 6-7 раз по сравнению «с нормой». Таким образом, характер экспрессии τ-протеина в гиппокампе и буккальном эпителии коррелирует с наличием БА и БП у людей старших возрастных групп.
5. Экспрессия α-синуклеина в гиппокампе у людей пожилого и старческого возраста с БА повышается в 8-9 раз, в буккальном эпителии - в 9 раз по сравнению с нормой. Экспрессия α-синуклеина в черной субстанции у людей пожилого и старческого возраста с БП повышается в 23-25 раз, в буккальном эпителии - в 12-16 раз, в фибробластах кожи - в 10-15 раз по сравнению «с нормой». Таким образом, характер экспрессии α-синуклеина

в гиппокампе и буккальном эпителии коррелирует с наличием БА и БП у людей старших возрастных групп.

6. Периферические ткани (буккальный эпителий и фибробласты кожи) отражают изменение экспрессии сигнальных молекул, характерных для различных отделов головного мозга при нейродегенеративных заболеваниях и старении организма.
7. Верификация экспрессии пептида Аβ42, τ-протеина и протеинкиназы С в буккальном эпителии является перспективным методом ранней диагностики БА, а оценка экспрессии пептида Аβ42 и α-синуклеина в буккальном эпителии и фибробластах кожи – методом предиктивной диагностики БП.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для прижизненной неинвазивной диагностики БА и БП у людей пожилого и старческого возраста рекомендуется изучение экспрессии сигнальных молекул (пептида Аβ42, τ-протеина, α-синуклеина, протеинкиназы С, маркера клеточного старения p16 и маркера апоптоза p53) в буккальном эпителии и фибробластах кожи методом иммуноцитохимии.
2. Для оценки темпа старения организма и нервной системы у людей пожилого и старческого возраста рекомендуется изучение экспрессии маркеров апоптоза и клеточного старения p16 и p53 в буккальном эпителии методом иммуноцитохимии.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Миннауки и высшего образования РФ*

1. Болезнь Паркинсона: от истории возникновения термина к перспективам прижизненной диагностики /М.А. Пальцев, Е.О. Кожевникова, В.А. Зуев, Н.С. Линькова, Т.В. Кветная, И.М. Кветной// Успехи физиологических наук. – 2018, Т. 49, №2. – С. 3-19.
2. Зуев В.А. Иммунологическая теория патогенеза болезни Альцгеймера: факты и гипотезы /В.А. Зуев // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 4: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28961> DOI 10.17513/spno.28961.
3. Зуев В.А. Роль иммунной дисфункции в патогенезе болезни Паркинсона у людей разного возраста /В.А. Зуев // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 3: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28904> DOI: 10.17513/spno.28904.
4. Мелатонин как молекулярный маркер возрастной патологии /В.А. Зуев, Н.И. Трифонов, Н.С. Линькова, Т.В. Кветная // Успехи геронтологии. – 2017. -Т. 30. - № 1. - С. 62–69.
5. Молекулярно-клеточные механизмы болезни Альцгеймера / М.А. Пальцев, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, Е.М. Пальцева, Т.В. Кветная, В.А. Зуев, И.М. Кветной, В.В. Попучиев // Молекулярная медицина. - 2016. –Т.14, №6. – С. 3-10.
6. 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.
7. Перспективы фармакотерапии болезни Альцгеймера /В.А. Зуев, А.С. Дятлова, Н.С. Линькова, И.М. Кветной // Успехи физиологических наук. 2018. Т.49. №4. С. 1-14.
8. Сравнительная характеристика экспрессии пептида Аβ42 и τ-протеина в гиппокампе, фибробластах кожи и букальном эпителии у пациентов пожилого и старческого возраста с болезнью Альцгеймера / В.А. Зуев, А.С. Дятлова, Н.С. Линькова, И.М. Кветной // Клиническая медицина. 2018. Т. 97. №1. С. 46-51.
9. Фармакотерапия болезни Паркинсона: молекулярные аспекты и перспективы /М.А. Пальцев, В.А. Зуев, А.С. Дятлова, Н.С. Линькова, Т.В. Кветная // Молекулярная медицина. – 2018. – Т.16, №2. – С. 3-14.
10. Фибробласты кожи как объект для прижизненной диагностики болезни Паркинсона у лиц разного возраста /В.А. Зуев, А.С. Дятлова, Н.С. Линькова, И.М. Кветной, Н.Н. Белушкина, М.А. Пальцев // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2019. №1. С. 63-67.
11. Фибробласты кожи как объект для прижизненной молекулярной диагностики болезни Альцгеймера /М.А. Пальцев, Н.С. Линькова, В.А. Зу-

- ев, В.О. Полякова, Н.Н. Белушкина, И.М. Кветной //Молекулярная медицина – 2018. – Т. 16, №5. – С. 61-64.
- 12.Экспрессия  $\alpha$ -синуклеина и пептида А $\beta$ 42 в черной субстанции и буккальном эпителии при болезни Паркинсона у людей разного возраста /В.А. Зуев, А.С. Дятлова, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, И.М. Кветной, М.А. Пальцев, У.Ф. Гашимова, А.М. Гаджиев // Молекулярная медицина. 2018. – Т. 16, № 6. – С. 35–40.
- 13.Экспрессия А $\beta$ 42,  $\tau$ -протеина, p16, p53 в буккальном эпителии: перспективы диагностики болезни Альцгеймера и темпа старения организма /В.А. Зуев, А.С. Дятлова, Н.С. Линькова, Т.В. Кветная // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т.166, №11. – С. 627-631.
- 14.А $\beta$ 42 – Перспективный неинвазивный маркер для прижизненной диагностики болезни Альцгеймера /В.А. Зуев, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, Е.М. Пальцева, Т.В. Кветная, Е.О. Куканова // Молекулярная медицина – 2017. – Т.15. - №1. – С. 24-27.
- 15.Inflamm-aging: молекулярное подтверждение роли медиаторов воспаления в патогенезе болезни Альцгеймера /И.М. Кветной, Н.С. Линькова, А.С. Дятлова, В.А. Зуев, Т.В. Кветная // Медицинский академический журнал. 2019. Специальный выпуск. С. 88 – 91.

### *Монография*

- 16.Пальцев М.А. Кветной И.М., Зуев В.А., Линькова Н.С., Кветная Т.В. Нейродегенеративные заболевания. Молекулярные основы патогенеза, прижизненной персонифицированной диагностики и таргетной фармакотерапии. Серия «Молекулярная патология». СПб., «Эко Вектор», 2019. 200 с.

### *Учебное пособие*

- 17.Линькова Н.С., Кветной И.М., Умнов Р.С., Зуев В.А., Кветная Т.В., Хавинсон В.Х. Молекулярная диагностика болезни Альцгеймера. Учебное пособие. СПб.: ООО "Русская корпорация", 2020. 46 с.

### *Главы в монографиях*

- 18.Очерк 2. Нейроиммуноэндокринные молекулярно-клеточные взаимодействия в головном мозге при болезни Альцгеймера (в соавторстве с Т.В. Кветной, В.А. Зуевым, Н.А. Красковской) в книге Молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний (лекционные очерки) (в соавторстве с М.А. Пальцевым, И.М. Кветным, В.О. Поляковой, Е.М. Пальцевой, С.У. Мурсаловым, У.К. Мурсаловым, Н.С. Линьковой, Р.Дж. Рейтером) СПб, 2016. Издательство «Н-Л». 176 с.
- 19.Очерк 3. Нейроиммуноэндокринные молекулярно-клеточные взаимодействия в головном мозге при болезни Хантингтона (в соавторстве с В.А. Зуевым, Е.О. Кукановой) в книге Молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний (лекционные очерки) (в соавторстве с М.А. Пальцевым, И.М. Кветным, В.О. Поляковой, Е.М. Пальцевой,

- С.У. Мурсаловым, У.К. Мурсаловым, Н.С. Линьковой, Р.Дж. Рейтером) СПб, 2016. Издательство «Н-Л». 176 с.
20. Часть II. Занятие 17. Роль и место нейроиммуноэндокринологии в практической молекулярной медицине (в соавторстве с В.В. Бенбериным, Н.С. Линьковой, Е.О. Кукановой, Т.В. Кветной, Д.С. Медведевым, В.А. Зуевым, Е.В. Седовым, К.Л. Козловым, А.В. Костылевым) в книге Молекулярная морфология. Методологические и прикладные аспекты нейроиммуноэндокринологии (в соавторстве с М.А. Пальцевым, И.М. Кветным, В.О. Поляковой, Е.М. Пальцевой, С.У. Мурсаловым) М.: Издательство «Шико», 2015. – 264 с.

#### *Тезисы докладов*

21. Буккальный эпителий как объект для ранней диагностики болезни Альцгеймера /Т.В. Кветная, В.А. Зуев, Е.О. Куканова, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова // V Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и при патологии» (20-23 июня 2017, Санкт-Петербург). – 2017. – С. 129.
22. Возможность выявления молекулярных маркеров болезни Паркинсона в крови /В.А. Зуев, Т.В. Кветная, Н.С. Линькова, И.М. Кветной // Научно-практическая конференция неврологов. XXI Всероссийская конференция «Нейроиммунология. Рассеянный склероз». V симпозиум «Возможности нейровизуализации». СПб., 30 ноября - 2 декабря 2017. В журнале «Нейроиммунология», Т. XIV, №2. С. 32-33.
23. Зуев В.А.  $\alpha$ -синуклеин в буккальном эпителии у лиц пожилого возраста как молекулярный маркер болезней Альцгеймера и Паркинсона /В.А. Зуев, Т.В. Кветная// Научно-практическая конференция «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии», посвященная 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии. 14-16 декабря 2017. С. 27.
24. Зуев В.А. Оценка возрастной динамики экспрессии амилоидных белков A $\beta$ 42 A $\beta$ 25-35 у пациентов с болезнью Альцгеймера /В.А. Зуев, Н.А. Красковская, Т.В. Кветная // 11 Международный форум «Старшее поколение». Санкт-Петербург, 2016. С. 59-60.
25. Зуев В.А. Роль каспаза-зависимого апоптоза в старении нейронов головного мозга в экспериментах *in vitro* /В.А. Зуев, Н.С. Линькова// Конференция «Биология и фундаментальная медицина в Санкт-Петербурге». Санкт-Петербург, 2016. – С. 122-123.
26. Зуев В.А. Экспрессия  $\alpha$ -синуклеина в черной субстанции и буккальном эпителии пациентов с болезнью Паркинсона /В.А. Зуев, А.Р. Ильина, Н.С. Линькова // «Неделя науки СПбПУ», 19-24 ноября 2018. Санкт-Петербург. С. 85-88.
27. Зуев В.А. 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 // Научно-практическая



- геронтологическая конференция «Пушковские чтения». Специалист здравоохранения. 2018. №4(18). С. 4-5.
28. *Ильина А.Р.* Экспрессия т-протеина и  $\alpha$ -синуклеина в черной субстанции головного мозга и фибробластах кожи у лиц разного возраста с болезнью Паркинсона /А.Р. Ильина, В.А. Зуев, Т.В. Кветная // Научно-практическая геронтологическая конференция «Пушковские чтения». Специалист здравоохранения. 2018. №4(18). С. 5-6.
29. *Ильина А.Р.* Экспрессия пептида А $\beta$ 42 в буккальном эпителии у лиц разного возраста с болезнью Альцгеймера /А.Р. Ильина, В.А. Зуев, Н.С. Линькова // «Неделя науки СПбПУ», 19-24 ноября 2018, С.-Петербург. С. 85-88.
30. *Красковская Н.А.* Уровни экспрессии белка р53 и амилоидного белка АВ25-35 у пациентов с болезнью Альцгеймера / Н.А. Красковская, В.А. Зуев, Т.В. Кветная // Международный форум «Старшее поколение». Санкт-Петербург, 2016. С. 71-72.
31. Перспективы применения периферических тканей для диагностики болезни Альцгеймера /В.А. Зуев, Н.С. Линькова, Т.В. Кветная, И.М. Кветной // Научно-практическая конференция неврологов. XXI Всероссийская конференция «Нейроиммунология. Рассеянный склероз». V симпозиум «Возможности нейровизуализации». СПб., 30 ноября - 2 декабря 2017. В журнале «Нейроиммунология», Т. XIV, №2. С. 33.
32. Экспрессия А $\beta$ 42 в буккальном эпителии – неинвазивный маркер для прижизненной диагностики болезни Альцгеймера /В.А. Зуев, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, Е.М. Пальцева, Т.В. Кветная // Научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы возрастной патологии в Арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты». Якутск, 2016. С. 141-143.
33. Экспрессия альфа-синуклеина в буккальном эпителии как диагностический маркер болезни Паркинсона /В.А. Зуев, Т.В. Кветная, Н.С. Линькова, И.М. Кветной // XIII Международный форум «Старшее поколение», 18-21 апреля 2018. СПб. – С. 56-57.
34. Экспрессия сигнальных молекул гиппокампа у людей старших возрастных групп с болезнью Альцгеймера /В.А. Зуев, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, Т.В. Кветная, И.М. Кветной // 12 Международный форум «Старшее поколение». Санкт-Петербург, 2017. С. 58.
35. Экстрапинеальный мелатонин: роль и значение в развитии болезни Альцгеймера и онкопатологии /И.М. Кветной, Н.С. Линькова, Т.В. Кветная, В.А. Зуев, А.С. Дятлова // XIV Международный форум «Старшее поколение», Санкт-Петербург, 2019. С. 63-64.
36. *Kraskovskaya N.A.* Strong correlation of age p16 protein expression dynamics with intensity of beta amyloid AB42 expression /N.A. Kraskovskaya, V.A. Zuev, N.S. Linkova // VI национальный конгресс геронтологов и гериатров Украины. Журнал «Проблемы старения и долголетия» Т. 25, приложение. 2016. – С. 112.



## УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

*Михайлусова О.И., Куташов В.А.* Болезнь Паркинсона: этиология, патогенез, клиника, диагностика и принципы лечения // Молодой ученый. – 2015. – №24. – С. 269-273; *Пальцев М.А. и др.* Молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний (лекционные очерки). СПб, 2016. Издательство «Н-Л». 176 с.; *Пчелина С.Н.* Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2011. – Т. 5. – № 4. – С. 46-51; *Anand R. et al.* Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future// Neuropharmacology. – 2014. – Vol. 76. – P. 27–50; *Ankarcrona M. et al.* Current and future treatment of amyloid diseases// J Intern Med. – 2016. – Vol. 10. – P. 12506; *Armstrong R.A.* A critical analysis of the 'amyloid cascade hypothesis'// Folia Neuropathol. –2014. – Vol. 52(3). – P.211–225; *Duplan E. et al.* Direct  $\alpha$ -synuclein promoter transactivation by the tumor suppressor p53 // Mol Neurodegener. - 2016. - № 2. - P.11-13; *François M. et al.* Altered cytological parameters in buccal cells from individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // Cytometry A. - 2014. - Vol. 85(8). - P. 698-708; *Jack C.R. et al.* Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade // Lancet Neurol. - 2010. - Vol. 9(1). - P. 119-128; *Janoshazi A. et al.* Alteration of protein kinase C conformation in red blood cells: a potential marker for Alzheimer's disease but not for Parkinson's disease // Neurobiol Aging. - 2006. - Vol. 27(2). - P. 245-251; *Jokinen P. et al.* Impaired cognitive performance in Parkinson's disease is related to caudate dopaminergic hypofunction and hippocampal atrophy // Parkinsonism and Related Disorders. 2009. V. 15(2). P. 88-93; *Khan T.K. et al.* PKC $\epsilon$  deficits in Alzheimer's disease brains and skin fibroblasts // J Alzheimers Dis. - 2015. - Vol. 43(2). - P. 491-509; *Kvetnoy I.M. et al.* Tau-Protein Expression in Human Buccal Epithelium: A Promising Non-Invasive Marker for Life-Time Diagnosis of Alzheimer's Disease // Journal of Advanced Biomarkers Research. – 2015. – N1. – P. 1-6; *Micheli F. et al.* Regulation of proapoptotic proteins Bak1 and p53 by miR-125b in an experimental model of Alzheimer's disease: Protective role of 17 $\beta$ -estradiol // Neurosci Lett. 2016. Vol. 629. P. 234-240; *Mukhamedyarov M.A. et al.* Transcriptional Analysis of Blood Lymphocytes and Skin Fibroblasts, Keratinocytes, and Endothelial Cells as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease // J Alzheimers Dis. - 2016. - Vol. 54(4). - P. 1373-1383; *Overk C.R., Masliah E.* Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease // Biochemical Pharmacology (journal). 2014. - V. 88. - № 4. - P. 508-516; *Pahwa R., Lyons K.E.* Handbook of Parkinson's Disease // NY: Informa Healthcare. 2007. - 557 pp.; *Perez M.J. et al.* Mitochondrial Bioenergetics Is Altered in Fibroblasts from Patients with Sporadic Alzheimer's Disease // Front Neurosci. - 2017. - Vol. 11. - P. 553; *Poewe W. et al.* Parkinson disease // Nat Rev Dis Primers. - 2017. - Vol. 3 - 17013; *Popugaeva E., Bezprozvanny I.* Can the calcium hypothesis explain synaptic loss in Alzheimer's disease? // Neurodegener Dis. - 2014. - Vol. 13(2-3). - P. 139-141; *Rodriguez-Leyva I. et al.* Parkinson disease and progressive supranuclear palsy: protein expression in skin // Ann Clin Transl Neurol. – 2016. - Vol. 3(3). - P. 191-199; *Simpson J.E., Ince P.G. et al.* Protein kinase C alteration is an early biochemical marker in Alzheimer's disease // J Neurosci. - 1991. - Vol. 11(9). - P. 2759-2767; *Sperling R.A. et al.* Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease // Alzheimers Dement. - 2011. - Vol. 7(3). - P. 280-292.