

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

**КОЗЛОВА  
ДАРЬЯ ИГОРЕВНА**

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И РЕГУЛЯЦИИ МЕТАЛЛОПЕПТИДАЗЫ  
НЕПРИЛИЗИНА В МОЗГЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.01.04 – биохимия

03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание научной степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2015

Работа выполнена в лаборатории сравнительной физиологии и патологии центральной нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научные руководители:

доктор биологических наук

**Журавин Игорь Александрович**

доктор биологических наук

**Наливаева Наталия Николаевна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

**Дубинина Елена Ефимовна**

ФГБУ РФ Санкт-Петербургский

научно-исследовательский

психоневрологический институт

им. В.М. Бехтерева, главный

научный сотрудник

доктор биологических наук

**Рыбникова Елена Александровна**

ФГБУН Институт физиологии

им. И.П. Павлова РАН, главный

научный сотрудник

Ведущая организация:

ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский

государственный университет

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в \_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУН Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Д 002.127.01). 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУН Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.127.01

доктор биологических наук

Р.Г. Парнова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.** Характерной тенденцией современного общества является увеличение продолжительности жизни. При этом наблюдается рост ряда заболеваний и патологических состояний, связанных с возрастом. Когнитивные нарушения и нейродегенеративные заболевания занимают одно из первых мест среди патологий пожилого и старческого возраста. В механизмах развития когнитивных и нейродегенеративных заболеваний большую роль играют генетические мутации и факторы риска (стресс, инсульты, инфаркты, нарушения функционирования эндокринной системы и другие патологические условия, в том числе патология пренатального развития). Литературные данные свидетельствуют о том, что повышенная продукция  $\beta$ -амилоидного пептида ( $A\beta$ ), а также возрастное снижение его катаболизма и транспорта является одним из факторов, приводящих к развитию патологических изменений нервной ткани, характерных для такого нейродегенеративного заболевания, как болезнь Альцгеймера (БА).

В настоящее время все большее внимание ученых сосредоточено на поисках соединений, повышающих способность ферментативных и транспортных систем мозга расщеплять  $A\beta$  и выводить его из нервной ткани, хотя нельзя не упомянуть о важности исследований, направленных на детальное изучение механизмов, приводящих к повышенному образованию  $A\beta$  из белка-предшественника (amyloid precursor protein, APP). Такое всестороннее изучение процессов метаболизма  $A\beta$  позволяет глубже понять роль разных ферментов в образовании и катаболизме  $A\beta$  и балансировать их активность с целью предотвращения накопления токсических концентраций  $A\beta$ , ведущих к патологическим изменениям, характерным для БА.

$A\beta$  представляет собой основной компонент внеклеточных фибриллярных отложений, характерных для БА, а его растворимые олигомеры являются наиболее токсичными для нервных клеток. Данный факт послужил основанием для поиска протеолитических ферментов, способных разрушать  $A\beta$  в ткани мозга и препятствовать его накоплению. Исследования последних лет показали, что металлопептидаза неприлизин (НЕП) является одним из самых мощных амилоид-деградирующих ферментов *in vivo* (Higuchi et al, 2005, Nalivaeva et al, 2012, 2014). Исследования на мышах с нокаутом гена НЕП, показали, что дефицит эндогенного НЕП повышает уровень  $A\beta$  в мозге в дозозависимой манере (Higuchi et al, 2005). С возрастом также наблюдается снижение содержания и активности НЕП в отдельных областях мозга крыс и мышей (гиппокамп, височная кора) (Nalivaeva et al, 2004, 2012; Caccamo et al, 2005). С другой стороны, было показано, что стереотаксические инъекции вирусных векторов, кодирующих ген НЕП, в

гиппокамп мышей, моделирующих БА, приводят к снижению содержания А $\beta$  в мозге. Большой практический интерес представляет тот факт, что инъекции аденоассоциированного вирусного вектора в периферические органы, такие, как сердце, способны вызвать еще больший эффект снижения амилоидных отложений в мозге и улучшение памяти (Iwata et al, 2013). Данный факт позволяет предположить, что НЕП, регулируя уровень А $\beta$  в периферических органах и крови, может играть важную роль в поддержании его баланса в ткани мозга, что важно для создания терапевтических подходов для предотвращения накопления А $\beta$  в нервной ткани.

Важно отметить, что у пациентов на ранней стадии развития БА также выявляются патологические изменения, характерные для снижения функций НЕП, наблюдаемые на модели трансгенных мышей. Уточнение роли снижения активности НЕП в патогенезе БА открывает возможность разработки тестов для ранней диагностики и поиска новых терапевтических подходов лечения данного заболевания.

Данная диссертационная работа посвящена изучению свойств и регуляции НЕП в структурах мозга и плазме крови крыс в норме и после пренатальной гипоксии, приводящей к снижению когнитивных функций в процессе развития и жизнедеятельности. Такое сравнительное исследование является важным и актуальным, поскольку дает возможность сопоставить взаимосвязь изменений экспрессии и активности НЕП с изменением когнитивных функций в постнатальном онтогенезе крыс в норме и после действия пренатальной гипоксии на 14-е сутки эмбриогенеза (E14). Исследования активности НЕП в плазме крови экспериментальных животных, проведенные параллельно с исследованиями данного показателя в структурах мозга, открывают возможность оценки корреляции изменений, происходящих в мозге, с использованием показателей плазмы крови, как наиболее доступного клинического материала, и предположить сходные изменения активности НЕП в плазме крови человека. Этот подход был положен в основу исследований на клиническом материале, что позволило оценить наличие корреляции между уровнем активности НЕП в плазме крови пациентов и степенью развития у них деменции. Это направление данной диссертационной работы является особенно актуальным, поскольку открывает возможность использования показателя активности НЕП в качестве маркера ранних изменений, приводящих к нейродегенерации и БА. С целью раскрытия молекулярных механизмов регуляции экспрессии гена НЕП и модуляции активности этого амилоид-деградирующего фермента в данной работе была использована культура клеток нейробластомы человека NB7. Проведенные исследования позволили продемонстрировать роль транскрипционного фактора AICD (amyloid precursor protein intracellular domain - внутриклеточный фрагмент APP), образующегося в процессе

формирования Аβ, а также протеолитических ферментов каспаз, в регуляции экспрессии гена НЕП при действии гипоксии, что позволило расширить пути поиска терапевтических агентов, способных изменять экспрессию гена НЕП и проанализировать эффект их действия на животных, что имеет большое теоретическое и практическое значение.

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Цель работы заключалась в исследовании изменений содержания и активности НЕП в нервной ткани и плазме крови млекопитающих в норме, при развитии когнитивных дисфункций (у крыс после пренатальной гипоксии или у человека при нейродегенеративных заболеваниях), а также изучение механизмов регуляции экспрессии НЕП с использованием клеточной (нейробластома человека NB7) и зоотропной (крысы) моделей. Для достижения данной цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Провести сравнительное исследование активности НЕП в теменной коре и гиппокампе мозга крыс линии Wistar в ходе нормального постнатального онтогенеза и после пренатальной гипоксии на 14-й день эмбрионального развития (E14), а также оценить изменение когнитивных функций у этих животных;

2. Сравнить экспрессию НЕП на уровне мРНК и белка, а также активность и локализацию НЕП в клетках нейробластомы NB7 в условиях нормального содержания кислорода и при гипоксии;

3. Исследовать уровень содержания мРНК и активность каспаз в клетках NB7 в условиях нормального содержания кислорода и при гипоксии;

4. Количественно оценить связывание транскрипционного фактора AICD с промотором гена НЕП в условиях нормального содержания кислорода и при гипоксии, а также оценить эффект применения ингибитора каспазы-3 на изменение уровня активности НЕП и процента связывания AICD с промотором гена НЕП в клетках NB7 при гипоксии;

5. Оценить эффект ингибитора каспазы-3 на изменение содержания AICD и экспрессии НЕП в теменной коре мозга и когнитивные функции взрослых крыс, перенесших пренатальную гипоксию на E14;

6. Выяснить особенности действия ингибитора гистондеацетилаз вальпроата натрия (valproic acid, VA) и антиоксиданта зеленого чая эпигаллокатехин-3-галлата (ЭГКГ) на активность НЕП в теменной коре и гиппокампе мозга и когнитивные функции взрослых крыс после гипоксии на E14;

7. Исследовать активность НЕП в плазме крови в нормальном онтогенезе крыс и после гипоксии на E14;

8. Исследовать активность НЕП в плазме крови пациентов без нарушений внимания и памяти, а также с диагнозом мягкого когнитивного снижения амнестического типа (a-

МКС) и БА, и провести анализ действия терапевтического препарата Цераксон® на активность НЕП в плазме крови пациентов с а-МКС.

### **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

1. Выяснено, что в коре и гиппокампе мозга крыс, как в ходе нормального постнатального онтогенеза, так и после пренатальной гипоксии, происходит снижение активности НЕП, обусловленное уменьшением его экспрессии. При этом наблюдается снижение когнитивных функций у старых крыс и у молодых крыс, перенесших пренатальную гипоксию.

2. При действии гипоксии снижение экспрессии НЕП происходит в результате уменьшения связывания транскрипционного фактора AICD с промотором гена НЕП, обусловленного активацией каспаз, субстратом которых является AICD. Введение ингибитора каспаз препятствует снижению экспрессии и активности НЕП после гипоксии как в клетках нейробластомы человека, так и у животных, перенесших пренатальную гипоксию.

3. Активность НЕП в плазме крови человека достоверно снижается при мягком когнитивном снижении и болезни Альцгеймера, что можно использовать в качестве дополнительного диагностического критерия для подтверждения диагноза а-МКС или БА у пациентов с нарушениями внимания и памяти, а также для оценки эффективности действия лекарственных препаратов.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ.** Впервые проведено исследование динамики активности НЕП в теменной коре и гиппокампе мозга с 10 по 570 дни постнатального онтогенеза крыс в норме и после действия пренатальной гипоксии на E14 и анализ взаимосвязи между уровнем снижения активности НЕП и изменением когнитивных функций.

Впервые установлено, что активность НЕП имеет разнонаправленные изменения в структурах мозга и плазме крови крыс, как в ходе постнатального онтогенеза, так и после гипоксии на E14.

Подробно рассмотрен один из возможных молекулярных механизмов регуляции экспрессии и активности НЕП при действии гипоксии. Впервые установлено снижение уровня связывания активирующего транскрипционного фактора AICD с промотором гена НЕП, коррелирующее с повышением уровня экспрессии и активности каспаз (в частности, каспазы-3) в клетках нейробластомы человека NB7, а также показано, что введение ингибитора каспаз препятствует снижению содержания AICD и активности НЕП, вызванного гипоксией, как в клетках нейробластомы, так и в мозге крыс после

пренатальной гипоксии на E14, что сопровождается улучшением их когнитивных функций.

Впервые исследованы показатели активности НЕП в плазме крови пациентов с диагнозом а-МКС и БА по сравнению с показателями у пациентов без нарушений внимания и памяти. Продемонстрировано наличие корреляции между уровнем снижения активности НЕП и степенью выраженности когнитивных нарушений при развитии БА, а также описаны изменения данного показателя при действии лекарственных препаратов, применяемых при лечении пациентов с а-МКС и БА.

### **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.**

Теоретическая важность данной работы заключается в раскрытии возможного молекулярного механизма регуляции экспрессии гена НЕП при гипоксии. С использованием клеток нейробластомы NB7 показано, что гипоксия приводит к повышению в клетках экспрессии и активности каспаз, субстратом которых является AICD. Это, в свою очередь, вызывает снижение уровня связывания транскрипционного фактора AICD, который регулирует экспрессию НЕП, с промотером его гена. При действии на гипоксические клетки ингибитора каспазы-3 в них наблюдается сохранение уровня связывания AICD с промотером гена НЕП и активности его белкового продукта. Установлено, что аналогичные механизмы работают и на зоотропной модели (крысы после гипоксии на E14, имеющие когнитивные дисфункции в постнатальном онтогенезе). Так в мозге крыс, перенесших гипоксию на E14, содержание AICD и активность НЕП восстанавливалась до контрольных значений при применении ингибитора каспазы-3, что также сопровождалось улучшением процессов запоминания и обучения у этих животных. Полученные данные позволяют расширить диапазон поиска мишеней для регуляции экспрессии и активности НЕП и других нейрональных генов с целью коррекции патологических изменений поведенческих реакций, памяти и обучения, индуцированных действием неблагоприятных факторов развития.

При проведении работы был налажен метод определения активности НЕП плазмы крови крыс и человека. Данные, полученные в ходе работы, продемонстрировали возможность использования показателя активности НЕП в плазме крови человека в качестве диагностического критерия, который позволяет прогнозировать наличие а-МКС или БА у пациентов с нарушениями внимания и памяти. Данный метод позволяет с высокой точностью и скоростью проводить анализ большого количества проб, при этом требуется небольшое количество крови, что актуально при работе с пожилыми людьми, которые тяжело переносят процедуры забора крови и зачастую имеют проблемы со свертываемостью. Полученные данные могут быть положены в основу создания

диагностического теста, позволяющего оценить степень развития патологических изменений и эффективность применяемых терапевтических средств.

**ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА.** Экспериментальные исследования, лабораторную обработку проб, статистический анализ полученных результатов автор проводил лично. В ходе работы автором был налажен флуориметрический метод определения активности НЭП в плазме крови крыс и человека.

**АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Результаты исследования были представлены на следующих отечественных и международных научных конференциях: V съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск (2008); XI и XII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург (2008, 2009); IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», Казань, (2009); Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria (2009); Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», Санкт-Петербург (2010); Joint Conference of Czech and Slovak Neuroscience Societies, Smolenice Castle, Slovakia (2011); III съезд физиологов СНГ, Ялта (2011); XIV Собрание и VII Школа по эволюционной физиологии, посвященной памяти академика Л.А. Орбели, Санкт-Петербург (2011); 15th Multidisciplinary International Conference on Neuroscience and Biological Psychiatry, St-Petersburg, Russia (2011); Конференция «Братья Орбели и развитие современной науки», Санкт-Петербург (2012); Конференция «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы», Москва (2012); 17th International Neuroscience Conference “Stress and Behavior”, St-Petersburg, Russia (2012); 38th FEBS Congress, Saint-Petersburg, Russia (2013); 5th European Society for Neurochemistry (ESN) Conference on Advances in molecular mechanisms underlying neurological disorders, Bath, UK (2013), Всероссийская конференция с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург - Колтуши (2014); IX конференция «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения», Санкт-Петербург (2014); ESN Conference “Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System”, Tartu, Estonia (2015).

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, результатов исследования,



обсуждения, заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Работа изложена на 140 страницах, содержит 1 таблицу и 29 рисунков. Список литературы включает 304 источника. Основные результаты диссертационной работы отражены в 24 публикациях (из них 3 научные статьи в рецензируемых журналах, 3 главы в 2-х коллективных монографиях и 18 тезисов докладов).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.**

В работе использовали крыс линии Wistar (*Rattus norvegicus*) из вивария Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. В экспериментах использовали модель пренатальной нормобарической гипоксии (Журавин и др., 2003). Для анализа содержания и активности НЕП в крови и структурах мозга использовали самцов крыс. Для исследования изменений активности НЕП в ходе постнатального онтогенеза крысы были разделены на 6 групп в зависимости от возраста (10, 20, 30, 105, 150, 570 суток после рождения). В выбранные для биохимических исследований периоды жизни крысы были разделены на две группы: крысы с нормальным эмбриональным развитием ( $n = 15$ ) и крысы, перенесшие пренатальную гипоксию на E14 ( $n = 15$ ). По достижении крысами возраста, заданного экспериментом, животные проходили процедуры тестирования их когнитивных способностей (Dubrovskaya et al, 2012; Журавин и др., 2014), после чего их декапитировали и выделяли зоны мозга, соответствующие теменной коре и гиппокампу согласно атласу (Paxinos and Watson, 1998, 2005). Одновременно у этих животных проводили забор крови. В тестировании когнитивных функций использовали следующие группы крыс: контроль – взрослые крысы контрольной группы в возрасте 4-х месяцев ( $n=14$ ), крысы, перенесшие только пренатальную гипоксию на E14 (группа E14,  $n=9$ ), и крысы, перенесшие пренатальную гипоксию на E14 и введение вальпроата натрия (VA, *i.p.*, 20 мг/0,1 мл физиологического раствора/кг веса) в возрасте 4-х месяцев ( $n=12$ ). Для исследования влияния введений ингибитора каспазы-3 на изменение экспрессии НЕП в ткани теменной коры крыс были исследованы следующие группы животных: контрольные крысы на 20 сутки постнатального онтогенеза ( $n = 8$ ); крысы из группы E14 на 20 сутки постнатального онтогенеза ( $n=8$ ); крысы из группы E14 с *i.v.* введением  $10^{-2}$ М ингибитора каспазы-3 - Ac-DEVD-CHO ( $n=6$ ); контрольные животные в возрасте 2 месяцев после рождения ( $n = 6$ ); группа E14 того же возраста ( $n = 6$ ); группа E14 (возраст – 2 месяца) через месяц после введения Ac-DEVD-CHO ( $n = 7$ ).

В работе также использовали клетки нейробластомы человека линии NB7 (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, США), которые культивировали при температуре 37°C в питательной среде RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), содержащей 10% сыворотку новорождённых телят, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин и заменимые аминокислоты (Bio Whittaker, Lonza Biologics, Slough, Англия). Клетки содержали в термостате во влажной атмосфере воздуха с содержанием углекислого газа (CO<sub>2</sub>) 5%. Для того, чтобы изучить эффекты гипоксии, клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C в O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> инкубаторе MC0-175M (Sanyo, Япония), в котором содержание кислорода поддерживалось на уровне 1% с помощью замещения его азотом. По истечении заданного экспериментом времени (24 часа) клетки быстро собирали на лёду и использовали для дальнейших экспериментов. В работе использовали методы экстракции и количественного определения РНК для оценки экспрессии НЕП и каспаз в клетках NB7 в нормоксических и гипоксических условиях, а также определение уровня связывания AICD с промотором гена НЕП при помощи модифицированного метода иммунопреципитации хроматина (Zuccato et al, 2007).

Активность НЕП определяли двухступенчатым флуоресцентным методом, в основе которого лежит способность НЕП расщеплять флуорогенный синтетический субстрат сукцинат-аланин-аланин-фенилаланин-7-амидо-4-метилкумарин (Sigma) между аланином и фенилаланином (Mumford et al, 1980), а высвобождение флуорофора (АМС) от фенилаланина происходит под действием лейцинаминопептидазы. Активность НЕП определялась по разнице между флуоресценцией продукта, полученного в результате инкубации анализируемых проб без и в присутствии специфического ингибитора НЕП тиорфана (Fisk et al, 2007).

Для определения экспрессии НЕП на уровне белка проводили электрофорез белков в полиакриламидном геле и последующее исследование методом иммуноблоттинга с использованием первичных антител к основной форме НЕП (Anti-CD10 antibody, Abcam ab126593; разведение 1:10000). Количество белка в пробах плазмы крови и мембранных фракций структур мозга определяли по методу М.М. Брэдфорд (Bradford, 1976), а для определения концентрации белка в лизатах клеток использовали бицинхониновый метод (Smith et al, 1985). Для изучения влияния гипоксии на локализацию НЕП в клетках нейробластомы NB7 также применяли методы иммуноцитохимии.

Для анализа взаимосвязи активности НЕП в плазме крови с уровнем когнитивных нарушений у человека в исследовании приняли участие пациенты с диагнозами мягкого когнитивного снижения амнестического типа (а-МКС) и БА, наблюдавшиеся в отделе гериатрической психиатрии отделения болезни Альцгеймера и ассоциированных с ней

расстройств научного центра психического здоровья Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НЦПЗ» РАМН) и пожилые люди, не имеющие нарушений когнитивных функций. Все испытуемые или их представители дали согласие на участие в тестировании их когнитивных функций и анализ биомаркеров плазмы крови. Образцы плазмы крови пациентов собирались в НЦПЗ РАМН у пациентов, прошедших психоневрологическое тестирование.

Статистический анализ данных проводился с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 с надстройками для проведения дисперсионного анализа ANOVA. Результаты анализа активности и содержания биохимических показателей представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность отличий оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента и различия считались значимыми при  $p < 0.05$ . Анализ результатов иммуноблоттинга проводился с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Сравнение средних значений в экспериментах по оценке кратковременной и долговременной памяти осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента для несвязанных выборок, либо с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, при этом значимыми считались различия при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Изменение активности и экспрессии неприлизина в ткани мозга крыс в ходе нормального онтогенеза и после пренатальной гипоксии.** Результаты биохимических исследований активности НЕП в мозге интактных крыс разных возрастных групп показали, что как в теменной коре (Рис. 1, А), так и в гиппокампе (Рис. 1, Б) мозга крыс активность НЕП максимальна на 10-е сутки после рождения и составляет  $163,3 \pm 2,9$  и  $127,8 \pm 7,9$  нмоль/мг/мин, соответственно. К 20-м суткам в обеих исследованных структурах происходит выраженное снижение активности данного фермента (на 40% и 79%, соответственно). Впоследствии динамика активности НЕП в теменной коре и гиппокампе мозга в ходе развития и взросления крыс имеет различный характер. Так, в теменной коре активность НЕП продолжает плавно снижаться до 570-го дня (в среднем на 15% на каждом возрастном интервале), в то время как в гиппокампе она существенно не меняется. Таким образом, можно заключить, что в течение постнатального онтогенеза активность НЕП снижается в теменной коре на 69% и в гиппокампе на 79%. Анализ активности НЕП в теменной коре (Рис. 1, А), и гиппокампе (Рис. 1, Б) крыс, перенесших пренатальную гипоксию на E14, который проводился в те же сроки постнатального развития, что и у контрольных крыс, показал, что динамика изменения активности НЕП в ходе постнатального онтогенеза в этих структурах мозга сходна с динамикой,

наблюдаемой в контрольной группе крыс, однако активность НЕП у этих животных ниже, чем в контроле. Анализ экспрессии НЕП на уровне белка в теменной коре мозга крыс показал, что самый высокий уровень экспрессии НЕП у крыс наблюдается на 10-й день развития и снижается на 90% в ходе постнатального онтогенеза к 150-му дню, что коррелирует со значительной степенью снижения экспрессии мРНК НЕП (Nalivaeva et al, 2012) в коре крыс того же возраста.

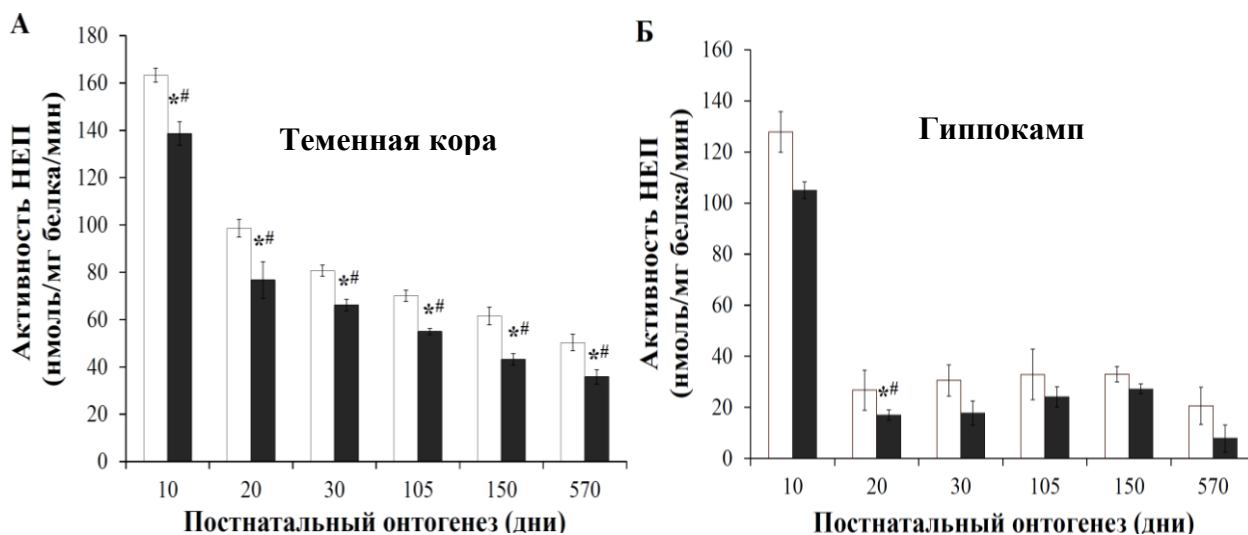


Рисунок 1. Онтогенетические изменения активности НЕП в теменной коре (А) и гиппокампе (Б) мозга крыс. Белым цветом обозначены показатели контрольной группы крыс; черным цветом - показатели группы крыс, перенесших гипоксию на Е14. \* - отличия от предыдущей возрастной группы достоверны при  $p < 0,05$ ; # - различия между контрольными животными и перенесшими гипоксию на Е14 в рамках одной возрастной группы достоверны при  $p < 0,05$ .

Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение активности НЕП в ходе постнатального онтогенеза в значительной мере обусловлено уменьшением его экспрессии на уровне белка. Поскольку уровень содержания НЕП в онтогенезе в теменной коре крыс снижается в большей степени, чем его активность, это позволяет сделать вывод о том, что с возрастом активность данного фермента, вероятнее всего, обусловлена присутствием его конформационно зрелой высокогликозилированной формы, которая локализуется в липидных рафтах плазматических мембран клеток (Sato et al, 2012). Этому заключению также соответствует тот факт, что с возрастом электрофоретическая подвижность НЕП снижается, свидетельствуя об увеличении молекулярной массы данного фермента, что особенно наглядно выражено на 150-й день развития.

**Сравнительное исследование изменений когнитивных функций и активности неприлизина в теменной коре мозга молодых и старых крыс.** Исследование формирования кратковременной памяти при помощи тестирования в радиальном двухуровневом лабиринте показало, что у старых (1,5 года) крыс количество ошибочных

побежек в 3,5 раз больше, чем у молодых (3-х месячных) (Рис. 2, А), при этом ухудшение процессов обучения и памяти крыс сопровождается снижением активности НЕП в 3,7 раза (Рис. 2, Б).

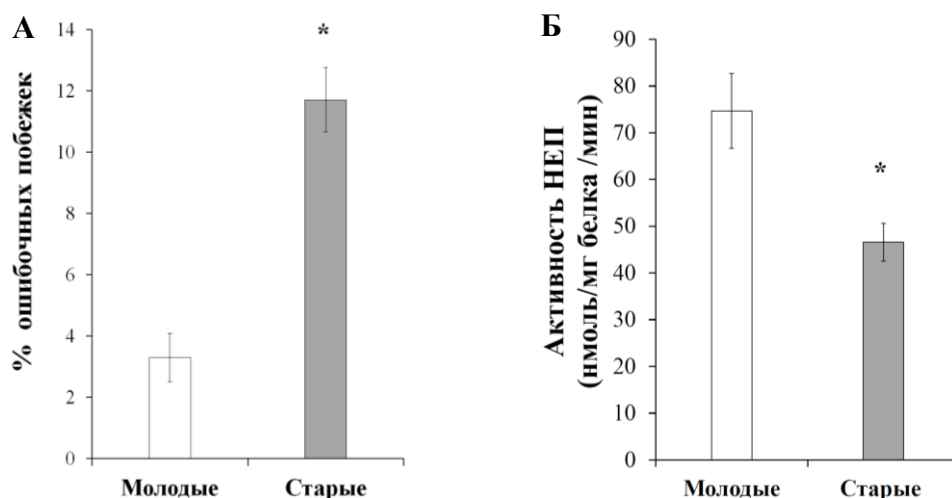


Рисунок 2. Эффект возраста на когнитивные способности крыс и активность НЕП. (А) Процент ошибочных побегов в двухуровневом радиальном лабиринте, регистрировавшихся в течение 10-12 дней. (Б) Активность НЕП в теменной коре. Группы животных: молодые интактные крысы (3 месяца, n=20), старые интактные крысы (1,5 года, n=9), \* - статистически достоверные различия при  $p < 0,05$ .

При тестировании взрослых крыс, перенесших пренатальную гипоксию, на фоне отсутствия изменений среднего времени нахождения крысы внутри рукава, процент правильных посещений кормушек по сравнению с контролем достоверно ( $p < 0,01$ ) снижался, что свидетельствует о нарушении процессов кратковременной памяти. Исследование памяти в тесте распознавания новых объектов у молодых и старых крыс также показало нарушение кратковременной (в течение 10 мин) и долговременной (в течение 60 мин или 24 час) памяти как у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, так и у интактных крыс в процессе старения.

**Механизмы регуляции НЕП.** Исследование, направленное на выявление механизмов регуляции экспрессии и активности НЕП с использованием клеток NB7, показало, что действие гипоксии (1%  $O_2$ , 24 часа) на культуру клеток NB7 приводит к снижению экспрессии мРНК НЕП на 32% (Рис. 3, А), экспрессии на уровне белка на 26% (Рис. 3, Б) и ферментативной активности на 43% относительно контроля (Рис. 3, В). Полученные данные согласуются с данными литературы (Fisk et al, 2007), что свидетельствует о валидности и хорошей воспроизводимости используемой клеточной модели. Важно отметить, что снижение экспрессии и активности НЕП при гипоксии происходит несмотря на увеличение уровня APP, показанного нами ранее (Nalivaeva et al, 2004), которое, как следствие, должно было бы приводить к повышению уровня

содержания AICD, регулирующего экспрессию НЭП и являющегося продуктом протеолитической деградации APP по амилоидогенному  $\beta$ -секретазному пути (Belyaev et al, 2010). Как было показано нами на использованной в работе клеточной модели, данный факт объясняется существенным повышением в клетках активности каспазы-3 (Рис. 3, Г) при гипоксии и увеличением деградации AICD, являющегося ее субстратом. Согласно данными литературы AICD является мишенью для расщепления каспазой-3 по сайту, расположенному у остатка аспартата 664 в молекуле APP (Weidemann et al, 1999, Gervais et al, 1999, Bertrand et al, 2001). Нами также было показано, что снижение экспрессии и активности НЭП обусловлено снижением уровня связывания AICD с промотором гена НЭП в условиях гипоксического воздействия (Рис. 3, Д). Этот эффект в значительной мере нивелировался при добавлении в питательную среду ингибитора каспазы-3 и инкубации клеток в гипоксических условиях (Рис. 3, Е). В присутствии ингибитора активность НЭП и уровень связывания AICD с промотором гена НЭП снижались в условиях гипоксии меньше, чем в отсутствие ингибитора каспазы-3.

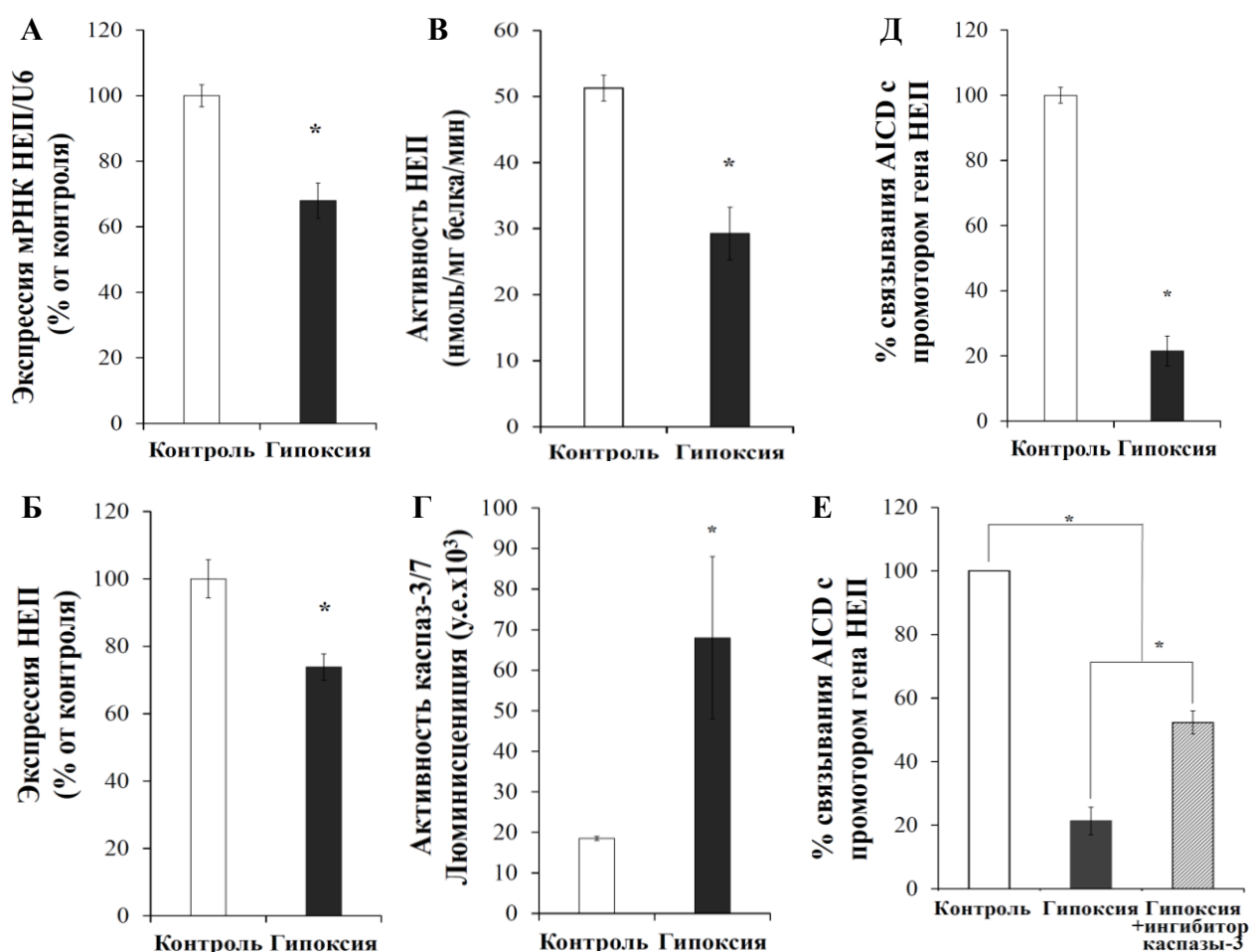


Рисунок 3. Эффект гипоксии на изменение в клетках NB7: А – содержания мРНК, Б – белка, В - активности НЭП, Г – активности каспаз-3/-7 в условных единицах люминесценции, Д - процента связывания AICD с промотором гена НЭП; Е - процента связывания AICD с промотором гена НЭП при действии ингибитора каспазы-3. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

Наличие в клетках механизма регуляция активности и экспрессии НЕП посредством AICD является важным фактором, поддерживающим содержание амилоидного пептида A $\beta$  на функциональном уровне и препятствующим его накоплению. Однако, его нарушение с возрастом может приводить к дефициту активности НЕП, вызывая накопление токсических форм A $\beta$  в ткани мозга и развитие БА. Еще более существенное снижение экспрессии и активности НЕП, вызванное ишемией и дефицитом кислорода в отдельных областях мозга, является фактором, повышающим риск развития спорадической формы БА. Полученные нами данные свидетельствуют, что индуцируемая гипоксией активация каспаз помимо ее апоптотического действия, также может быть причиной повышенного расщепления С-терминального фрагмента APP, приводя к снижению уровня содержания в ткани мозга транскрипционного фактора AICD, а соответственно и к снижению экспрессии и активности A $\beta$ -деградирующего фермента НЕП и других нейрональных генов, вовлеченных в катаболизм A $\beta$ , в частности, транспортного белка транстиретина, также регулируемого AICD (Kerridge et al, 2014). Более того, в нашем исследовании впервые показано, что процесс регуляции НЕП посредством AICD при гипоксии также имеет место и в ткани мозга крыс (Рис. 4) и изменение уровня активности каспазы-3 отражается на снижении или восстановлении когнитивных функций.

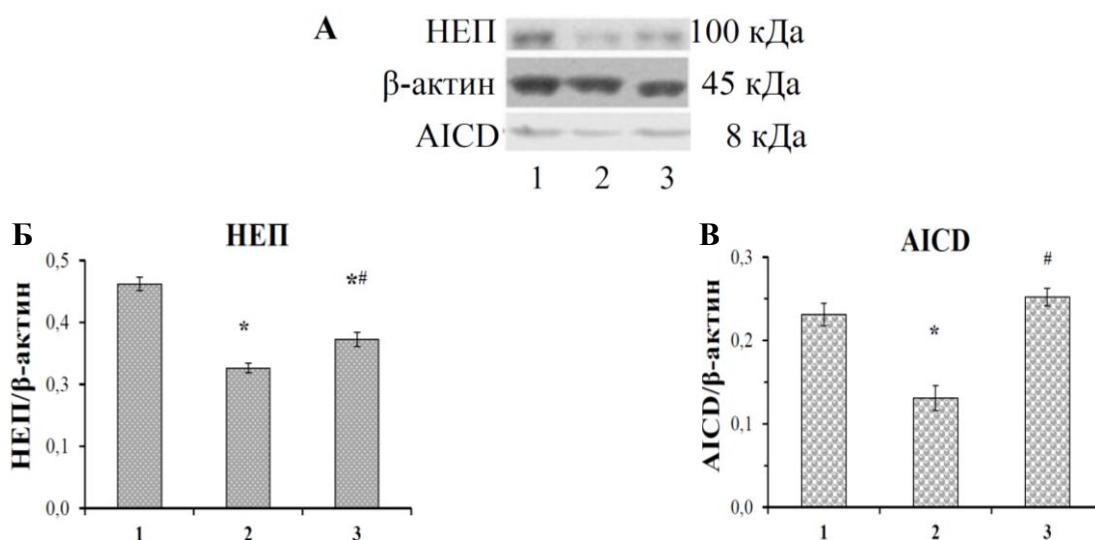


Рисунок 4. Иммунохимический анализ содержания НЕП и AICD в гомогенатах коры мозга крыс. Картина электрофоретического разделения белков (А). Количественная оценка содержания НЕП (Б) и AICD (В) выражена относительно контрольного белка ( $\beta$ -актин). **1** - контрольные крысы; **2** - крысы, перенесшие гипоксию на E14; **3** - через 3 сут после однократного *i.v.* введения ингибитора каспазы-3 крысам, перенесшим пренатальную гипоксию на E14. \* - статистически значимые отличия от значений у контрольных крыс, # - статистически значимые отличия от значений у крыс, перенесших пренатальную гипоксию без введения ингибитора каспаз ( $p < 0,05$  U-критерий Манна-Уитни).

Эти результаты существенно расширяют представления о функциональной роли данного механизма эпигенетической регуляции. Поскольку AICD-зависимая регуляция НЭП является важным механизмом поддержания экспрессии и активности этого фермента на необходимом физиологическом уровне, исследование молекулярных процессов, обеспечивающих ее реализацию, имеет большое значение для разработки терапевтических стратегий контроля за содержанием амилоидного пептида в нервной ткани.

Как известно из литературных данных, регуляция уровня экспрессии НЭП осуществляется путем конкурентного связывания AICD с промотором его гена, инактивация которого обусловлена присутствием на нем гистондеацетилаз (в частности, HDAC1 и HDAC3). Последние поддерживают плотно упакованную конформацию хроматина на этом участке ДНК за счет деацетилирования нуклеосомных белков (Belyaev et al, 2009). Полученные нами данные свидетельствуют, что введение ингибитора гистондеацетилаз вальпроата натрия крысам, перенесшим пренатальную гипоксию на E14, приводит к повышению активности НЭП в теменной коре и гиппокампе по сравнению с животными, которым вводили физраствор. У исследованных крыс, получавших ВА, также отмечалось улучшение краткосрочной и долговременной памяти, наблюдавшееся при проведении поведенческих тестов в двухуровневом 8-лучевом радиальном лабиринте и модифицированном тесте распознавания новых объектов. Полученные нами данные согласуются с данными литературы по введению вальпроата натрия *in vitro* и *in vivo* как на уровне изменения экспрессии и активности НЭП, так и на уровне поведенческих реакций и памяти у животных (Qing et al, 2008; Morrison et al, 2007; Kilgore et al, 2010; Zhuravin et al, 2011; Nalivaeva et al, 2012). Данное направление исследований представляет большой практический интерес, поскольку может быть использовано при разработке терапевтических подходов для профилактики и лечения БА.

Помимо оценки изменения активности НЭП в структурах мозга крыс в ходе нормального онтогенеза и после пренатальной гипоксии на E14, нами также был проведен анализ активности данного фермента в плазме крови. Анализ активности НЭП в плазме крови выполнялся на тех же экспериментальных животных, что и для анализа в структурах мозга, чтобы иметь возможность сравнить показания и выявить корреляции с изменениями в мозге. Выявлено, что в первые 10 дней постнатального онтогенеза активность НЭП в плазме крови имеет самые высокие значения. К 20-му дню активность фермента снижается в 4 раза, а далее постепенно повышается к 570 дню в 3 раза по сравнению с 20-м днем. Важно отметить, что в теменной коре имеет место снижение активности НЭП в 3 раза к 570-му, что сопоставимо с уровнем повышения активности



НЕП в плазме. Вероятно, это может быть связано с компенсаторной ролью НЕП, экспрессируемого на периферии, в ответ на снижение активности данного фермента в теменной коре мозга с целью поддержания гомеостаза уровня нейропептидов, циркулирующих в крови и в спинномозговой жидкости.

**Исследование активности НЕП в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера и мягким когнитивным снижением амнестического типа.** Поскольку НЕП играет важную роль в расщеплении амилоидного пептида и рассматривается как один из основных ферментов регуляции его содержания в мозге, дефицит НЕП сейчас связывают с риском развития спорадической формы БА. Исследование биоптатов головного мозга и спинномозговая пункция является травматичными методами, не показанными людям пожилого и старческого возраста. Напротив, взятие образцов крови является малоинвазивным методом, а сама плазма крови - наиболее доступным для исследования клиническим материалом. В ходе проведенного нами исследования было выявлено статистически значимое снижение активности НЕП в плазме крови пациентов, коррелирующее с уровнем развития деменции. При анализе биохимических показателей было выявлено, что в группе пациентов с диагнозом мягкого когнитивного снижения амнестического типа (а-МКС) уровень активности НЕП был в среднем ниже на 19% ( $p < 0.05$ ), чем в контрольной группе, в то время как у пациентов с диагнозом БА активность НЕП была ниже контроля в среднем на 42% (Рис. 5, А). Полученные нами данные по изменению активности НЕП в плазме крови у лиц с а-МКС и БА схожи с данными по изменению активности этого фермента в теменной и фронтальной коре головного мозга аналогичных групп пациентов, опубликованными в литературе (Huang et al, 2012). Нами также было показано, что при лечении пациентов с диагнозом а-МКС препаратом Цераксон® (цитиколин), активность НЕП повышается до контрольных значений, в то время, как у пациентов, принимавших плацебо, изменений активности НЕП обнаружено не было (Рис. 5, Б).

В литературе существуют сведения о том, что препарат цераксон эффективен при лечении когнитивных расстройств (Гаврилова и др., 2011), однако воздействие данного препарата на исследуемый нами фермент показано впервые. Полученные нами данные могут быть положены в основу диагностического теста, позволяющего достоверно различить состояние пациентов, характерное для а-МКС или БА и оценить эффективность применяемых терапевтических средств.

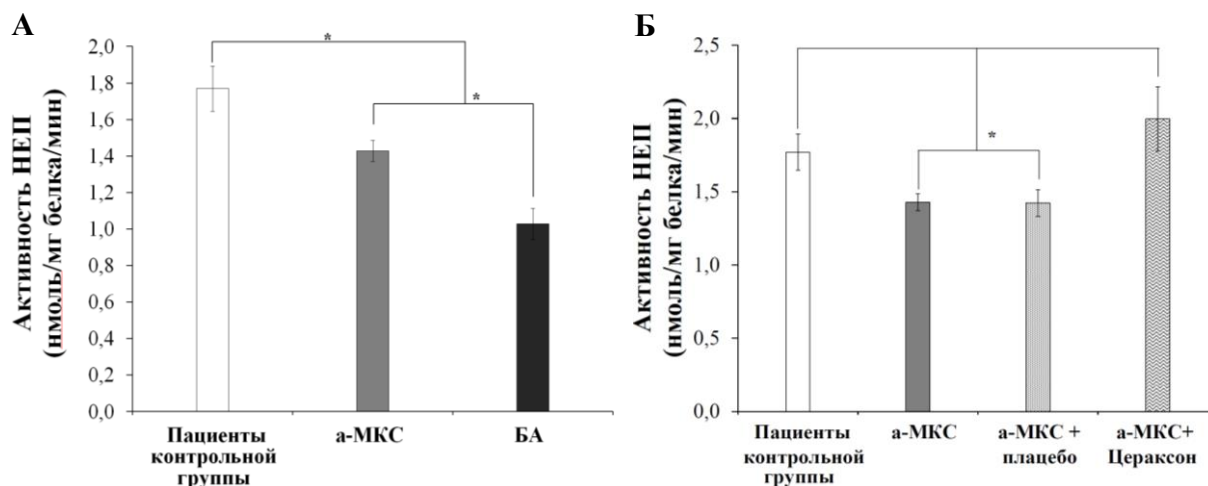


Рисунок 5. Активность НЕП в плазме крови пациентов: А – контрольной группы, группы с диагнозом а-МКС и болезни Альцгеймера; Б – контрольной группы, группы с диагнозом а-МКС при лечении цераксоном или получавшим плацебо. \* - различия между группами достоверны при  $p < 0,05$ .

В заключение следует отметить, что проведенное в данной диссертационной работе исследование позволило получить приоритетные данные, характеризующие динамику экспрессии и активности металлопептидазы НЕП в ткани мозга и крови крыс, а также раскрывающие молекулярные механизмы регуляции экспрессии НЕП в нормальном онтогенезе млекопитающих и при действии патологических факторов. На клеточной модели (клетки нейробластомы NB7) показано, что при гипоксии повышается экспрессия и активность каспаз, а также снижается степень связывания транскрипционного фактора AICD, являющегося их субстратом, с промотором гена НЕП. Выяснено, что ингибиторы каспазы-3 позволяет регулировать экспрессию НЕП за счет увеличения связывания транскрипционного фактора AICD с промотором гена исследованного фермента. На зоотропной модели (крысы после гипоксии на E14, имеющие когнитивные дисфункции в постнатальном онтогенезе) показано, что аналогичный механизм реализуется и у животных, и что применение ингибитора каспазы-3 приводит к восстановлению содержания AICD и активности НЕП у животных, подвергавшихся действию пренатальной гипоксии, до уровня, регистрируемого у контрольных крыс. Альтернативный механизм регуляции экспрессии НЕП путем ингибирования гистондеацетилаз вальпроатом натрия или воздействием антиоксиданта зеленого чая - эпигаллокатехин-3-галлата, также приводит к восстановлению уровня активности НЕП в мозге до контрольных значений. При этом у всех групп животных с введением перечисленных выше соединений наблюдается улучшение процессов запоминания и обучения.

Впервые установлено, что активность НЕП имеет разнонаправленные изменения в структурах мозга и плазме крови крыс, как в ходе постнатального онтогенеза, так и после

гипоксии на E14. Данные, полученные в ходе работы, продемонстрировали возможность использования активности НЕП в плазме крови человека в качестве диагностического критерия, который позволяет подтвердить диагноз а-МКС и наличие риска дальнейшего развития БА у пациентов с нарушениями внимания и памяти. В работе впервые продемонстрировано наличие корреляции между уровнем снижения активности НЕП в плазме крови пациентов с диагнозом а-МКС и БА и степенью выраженности когнитивных нарушений, а также при действии лекарственных препаратов. Эти данные могут быть положены в основу диагностического теста, позволяющего оценить степень развития патологических изменений и эффективность применяемых терапевтических средств.

## **ВЫВОДЫ**

1. В нормальном онтогенезе крыс с 10-го по 570-й день постнатального развития происходит уменьшение активности металлопептидазы НЕП в 3 раза в теменной коре и в 5 раз в гиппокампе, что сопровождается ухудшением когнитивных функций, наблюдаемым в поведенческих тестах;

2. Пренатальная гипоксия на E14 приводит к снижению ферментативной активности НЕП в коре и гиппокампе мозга на всех исследованных этапах развития крыс, что обусловлено снижением его экспрессии на уровне белка, и сопровождается ухудшением процессов обучения и памяти;

3. На клетках нейробластомы человека NB7 впервые установлено, что снижение экспрессии НЕП на уровне мРНК и белка, а также уменьшение его ферментативной активности при гипоксии обусловлено пониженным связыванием транскрипционного фактора AICD с промотором гена НЕП вследствие его деградации каспазами. Добавление ингибитора каспаз к клеткам при гипоксии сохраняет уровень связывания AICD с промотором, препятствуя уменьшению экспрессии и снижению активности НЕП;

4. Введение ингибитора каспазы-3 крысам, перенесшим пренатальную гипоксию на E14, приводит к повышению уровня AICD и экспрессии НЕП в коре головного мозга и к улучшению поведенческих реакций по сравнению с животными, не получавшими этот препарат;

5. Введение крысам, перенесшим пренатальную гипоксию, ингибитора гистондеацетилаз вальпроата натрия или антиоксиданта эпигаллокатехин-3-галлата приводит к восстановлению уровня активности НЕП в мозге до контрольных значений, что коррелирует с улучшением когнитивных функций у этих животных;

6. Активность НЕП в плазме крови крыс имеет самый высокий показатель на 10 день после рождения и снижается на 20 день, однако затем наблюдается ее постепенное повышение с возрастом. Пренатальная гипоксия также приводит к повышению

активности НЕП, что может иметь компенсаторный характер для сохранения баланса активности этого фермента в ткани мозга и на периферии;

7. Впервые показана корреляция уровня активности НЕП в плазме крови пациентов с мягким когнитивным снижением и болезнью Альцгеймера, а также нормализация его активности при лечении препаратом Цераксон® (цитиколин), что позволяет рассматривать НЕП в качестве маркера для диагностики ранних когнитивных нарушений и для оценки эффективности лекарственных препаратов.

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

### **Статьи в научных журналах**

1. Журавин И.А., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Багрова (Козлова) Д.И., Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Наливаева Н.Н. Когнитивные расстройства в онтогенезе млекопитающих при нарушении пренатального развития // Журнал «Психиатрия». – 2010. – № 4. – С. 36-43.

2. Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I., Pickles A.R., Makova N.Z., Bagrova (Kozlova) D.I., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J. Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats // J. Mol. Neurosci. – 2012. – V. 46. – P. 569-577.

3. Козлова Д.И., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Туманова Н.Л., Журавин И.А. Роль каспазы-3 в регуляции содержания амилоид-деградирующей нейрорептидазы неприлизина в коре головного мозга крыс при гипоксии // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2015. – Т. 51. – №6. – С. 451 – 454.

### **Тезисы докладов**

1. **Багрова Д.И., Кочкина Е.Г.** Активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в плазме крови при развитии когнитивных нарушениях // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11-15 мая 2008 г., Новосибирск. с. 419.

2. **Багрова Д.И., Кочкина Е.Г.** Активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в плазме крови крыс и человека при развитии когнитивных нарушений // XI Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье» «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург, 19 апреля 2008 г., с. 22-23.

3. **Багрова Д.И.** Активность ацетил- и бутирилхолинэстеразы в плазме крови при когнитивных нарушениях у человека и животных // XII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург, 18-19 апреля 2009 г., с. 31-32.

4. **Багрова Д.И.** Активность холинэстераз в плазме крови при патологии у человека и животных // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», Казань, 23-27 июня 2009 г., с. 330.

5. **Nalivaeva N.N., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Bagrova D.I., Turner A.J., Zhuravin I.A.** Modulation of the effects of ageing and hypoxia on amyloid-degrading enzymes and memory in rats // Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria, 20-23 July, 2009, p. 66, P 45.

6. **Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Kochkina E.G., Bagrova D.I., Turner A.J., Zhuravin I.A.** Regulation of amyloid-degrading enzymes changed by ageing or hypoxia // Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», Санкт-Петербург, 7-9 декабря 2010 г., с. 207.

7. **Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Zhuravin I.A., Plesneva S.A., Dubrovskaya N.M., Bagrova D.I., Vasilev D.S., Tumanova N.L., Babusikova E., Dobrota D., Turner, A.J.** Epigenetic regulation of Alzheimer's disease related genes // Joint Conference of the Czech and Slovak neuroscience societies. Smolenice Castle, Slovakia, May 18-21, 2011, p. 38.

8. **Журавин И.А., Алексеева О.С., Багрова Д.И., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Морозова А.Ю., Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Наливаева Н.Н.** Исследование механизмов нарушения когнитивных функций в онтогенезе млекопитающих // Научные труды III съезда физиологов СНГ, Ялта, Украина, 1-6 октября 2011 г., с. 37.

9. **Багрова Д.И.** Исследование активности фермента деградации амилоидного пептида – неприлизина в онтогенезе крыс // Тезисы докладов XIV Совещания и VII Школы по эволюционной физиологии, посвященной памяти академика Л.А. Орбели, Санкт-Петербург, 24-29 октября 2011 г., с. 23.

10. **Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Plesneva S.A., Bagrova D.I., Vasilev D.S., Tumanova N.L., Alexeeva O.S., Zhuravin I.A.** Enzymes metabolizing amyloid-beta peptide affect cognitive functions in rat after prenatal stress // 15th Multidisciplinary International Conference on Neuroscience and Biological Psychiatry. St-Petersburg, Russia, May 16-20, 2011, p. 33.

11. **Багрова Д.И., Гаврилова С.И., Федорова Я.Б., Плеснева С.А., Журавин И.А.** Исследование потенциальных преклинических маркеров для выявления синдрома мягкого когнитивного снижения у пациентов с нарушением памяти // Конференция «Братья Орбели и развитие современной науки», Санкт-Петербург, 1-2 октября 2012 г., с. 12-14.
12. **Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Багрова Д.И., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г., Гаврилова С.И., Федорова Я.Б., Макова Н.З., Беляев Н.Д., Beckett C., Turner A.J.** Изучение механизмов регуляции амилоид-деградирующего фермента неприлизина и пластичности нейронной сети мозга при моделировании когнитивных нарушений с целью поиска путей профилактики болезни Альцгеймера // Конференция «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы», Москва, 1-2 ноября 2012 г., с. 20-22.
13. **Bagrova D.I., Nalivaeva N.N., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Turner A.J., Zhuravin I.A.** Effects of stress on the activity of a neuropeptidase neprilisin in rat brain structures // 17th International “Stress and Behavior” Neuroscience Conference, St-Petersburg, Russia, May 16-19, 2012, с. 21.
14. **Nalivaeva N.N., Plesneva S.A., Bagrova D.I., Dubrovskaya N.M., Kochkina E.G., Vasilev D.S., Zhuravin I.A.** Deciphering biochemical processes underlying cognitive functions and neuronal plasticity in the brain. Abstracts of the 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013, V. 280, (Suppl. 1), p. 427.
15. **Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Kozlova D.I., Vasilev D.S., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Tumanova N.L., Alekseeva O.S., Nalivaeva N.N.** Study of the role of caspase-3 in development of neuronal plasticity in rat brain // 5<sup>th</sup> ESN Conference on Advances in Molecular Mechanisms Underlying Neurological Disorders, Bath, UK, 23-26 June, 2013, p. 46.
16. **Козлова Д.И., Васильев Д.С., Журавин И.А.** Изменение содержания различных форм амилоид-деградирующей протеазы неприлизин в ткани головного мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию // Труды IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения», Санкт-Петербург, 20-22 ноября 2014 г., Т. 9, № 1, с. 130-135.
17. **Kozlova D.I., Plesneva S.A., Gavriloa S.I., Fedorova Ya. B., Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A.** Cholinesterases and neprilysin activities in blood plasma of patients with mild cognitive impairment as markers of disease progression and therapeutic efficacy // Всероссийская конференция с международным участием «Нейрохимические механизмы

формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург-Колтуши, 24-26 июня 2014 г., с. 10.

18. **Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Kozlova D.I., Tumanova N.L., Turner A.J., Nalivaeva N.N.** Role of caspase-3 in development of neuronal plasticity and memory // ESN Biannual Conference: Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System, Tartu, Estonia, 14-17 June, 2015. Springer Plus 2015, V. 4, Suppl. 1, P. 32.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AICD - Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain, внутриклеточный фрагмент белка предшественника амилоидного пептида;

A $\beta$  – Amyloid  $\beta$ -peptide,  $\beta$ -амилоидный пептид;

APP - amyloid precursor protein;

a-МКС- амнестический тип мягкого когнитивного снижения;

Ac-DEVD-CHO - Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO, необратимый ингибитор каспазы-3 (7);

БА – болезнь Альцгеймера;

E14 – 14 день эмбрионального развития;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НЕП – нейтральная эндопептидаза, неприлизин;

ФГБНУ НЦПЗ РАМН – Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение Научный Центр Психического Здоровья;

ЭГКГ или EGCG - эпигаллокатехин-3-галлат.