

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ПЕТРА ВЕЛИКОГО»

на правах рукописи

ПОПУГАЕВА

Елена Александровна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИИ В
НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА – НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ БОЛЕЗНИ
АЛЬЦГЕЙМЕРА**

14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология

03.03.01 - физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

д.б.н, профессор

Безпрозванный Илья Борисович

Санкт-Петербург 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	7
Актуальность темы исследования.....	7
Степень разработанности темы исследования.....	9
Цель исследования.....	10
Задачи исследования	10
Научная новизна	11
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы исследования.....	12
Положения, выносимые на защиту	13
Степень достоверности полученных результатов	14
Апробация результатов	14
Личный вклад соискателя	14
Внедрения в практику	15
Публикации	15
Структура и объем диссертации.....	16
Финансовая поддержка работы	16
Благодарности	17
Глава 1 Обзор литературы	18
1.1 Кальциевая гипотеза болезни Альцгеймера	19
1.2 Молекулярно-биологические основы кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа при БА	20
1.2.1 Роль бета-амилоида в регуляции кальциевого сигналинга в нейронах.....	20
1.2.2 Роль пресенилинов в регуляции кальциевого сигналинга в нейронах.....	24
1.3 Потеря числа грибовидных дендритных шипиков в трансляционных моделях БА - фенотипическое проявление БА	28
1.4 Кальций зависимые сигнальные пути регулирующие устойчивость грибовидных шипиков	30

1.5	Создание трансляционных генетических моделей болезни Альцгеймера как способ изучения патогенеза заболевания и механизма действия фармакологических агентов	33
1.6	Существующая и разрабатываемая фармакотерапия болезни Альцгеймера на основе модуляторов NMDAR и VGCC	34
1.7	Рецепторы осуществляют тонкую регулировку нейронального кальциевого сигналинга и могут выступать в качестве потенциальной терапевтической мишени	36
1.8	Нарушение нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах при БА	37
1.9	TRPC6 в качестве молекулярной мишени для разработки лекарственной терапии БА	42
	Глава 2 Объекты и методы исследования	46
2.1	Химические соединения и плазмиды	46
2.2	Вирусы	47
2.3	Приготовление олигомерных форм A β 40 и A β 42	47
2.4	Атомно-силовая микроскопия олигомерных форм A β 40, A β 42, A β 42-Alexa-555	48
2.5	Биоинформатический анализ биологической активности и побочных эффектов у химических соединений	48
2.6	Приготовление первичной культуры гиппокампа	50
2.7	Иммуноцитохимия	50
2.8	Кальций фосфатная трансфекция первичных нейронов гиппокампа	51
2.9	Анализ морфологии дендритных шипиков в первичных культурах гиппокампа	53
2.10	Измерение осцилляций внутриклеточного кальция с использованием красителя Fura-2AM	54
2.11	Измерение осцилляций внутриклеточного кальция с использованием красителя Fluo-3AM	55
2.12	Измерение нДУВК в постсинаптических дендритных шипиках с использованием плазмиды GCaMP5.3	55
2.13	Мыши	56

2.14	Этика	57
2.15	Генотипирование мышей	57
2.16	Стереотаксические инъекции вирусов в СА1-область гиппокампа мышей	58
2.17	Анализ морфологии дендритных шипиков в срезах мозга	59
2.18	Приготовление лизатов гиппокампа	60
2.19	Вестерн-блот анализ	60
2.20	Приготовление тонких срезов головного мозга мыши	61
2.21	Иммуногистохимическое окрашивание тонких срезов антителами, специфичными к бета-амилоиду	61
2.22	Анализ количества амилоидных бляшек в срезах мозга	62
2.23	Подготовка срезов гиппокампа	62
2.24	Электрофизиологические эксперименты по записи долговременной потенциации (ДВП)	63
2.25	Модель экспериментальной ишемии	64
2.26	Анализ когнитивных функций животных (тест «лабиринт Барнс»)	64
2.27	Статистическая обработка результатов	64
Глава 3 Результаты исследований		66
3.1	Разработка модели низкой амилоидной синаптотоксичности	66
3.1.1	Исследование роли кальциевой дисрегуляции в изменении морфологии дендритных шипиков на модели низкой амилоидной токсичности	67
3.2	Молекулярно-биологическое обоснование участия депо-управляемых кальциевых каналов в поддержании морфологии дендритных шипиков <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	75
3.2.1	Экспрессия сенсора концентрации ионов кальция в ЭПР – стромальной молекулы взаимодействия 2 - снижается в ответ на добавление амилоидных олигомеров <i>in vitro</i>	75
3.2.2	Гиперэкспрессия стромальной молекулы взаимодействия 2 защищает грибовидные шипики от синаптотоксического действия амилоидных олигомеров <i>in vitro</i>	77
3.2.3	Влияние амилоидных олигомеров на потерю грибовидных шипиков <i>in vivo</i>	79
3.2.4	Инъекция олигомеров А β 42 вызывает подавление экспрессии стромальной молекулы взаимодействия 2 в гиппокампе <i>in vivo</i>	81

3.2.5 Гиперэкспрессия стромальной молекулы взаимодействия 2 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности <i>in vivo</i>	83
3.2.6 Регуляция уровня экспрессии гена стромальной молекулы взаимодействия 2 методами генетической инженерии влияет на число амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD.....	86
3.2.7 Анализ количества амилоидных бляшек в головном мозге мышей линии 5xFAD	87
3.2.8 Гиперэкспрессия белка STIM2 снижает количество амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD	89
3.3 Фармакологический анализ целесообразности коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа для лечения болезни Альцгеймера	91
3.3.1 Нейропротекторные свойства соединения N17 в <i>in vitro</i> модели амилоидной синаптотоксичности.....	91
3.3.2 Соединение N17 активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа <i>in vitro</i>	94
3.3.3 Соединение N17 не активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа в отсутствие каналов TRPC6	96
3.3.4 Соединение N17 улучшает показатели краткосрочной памяти у крыс в тесте «лабиринт Барнс» при моделировании ишемии головного мозга	99
3.4 Поиск и анализ нейропротекторной активности фармакологически активных химических соединений - модуляторов нейронального депо-управляемого входа кальция	101
3.4.1 Биоинформатический поиск активаторов каналов TRPC6	101
3.4.2 Скрининговые исследования <i>in vitro</i> фармакологической активности соединений – потенциальных агонистов каналов TRPC6.....	105
3.4.3 Исследование каналов TRPC6 в качестве фармакологической мишени соединения 51164	111
3.4.4 Соединение 51164 восстанавливает депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности	114
3.4.5 Соединение 51164 восстанавливает дефицит инициации долговременной потенциации у 6-месячных 5xFAD мышей	116

3.5 Антагонист нейронального депо-управляемого входа кальция оказывает протекторное действие на нейроны, экспрессирующие мутантный PSEN1ΔE9, при наследственной форме болезни Альцгеймера.....	118
3.5.1 Мутация PSEN1ΔE9 вызывает снижение процента грибовидных шипиков и увеличивает процент тонких шипиков в культуре гиппокампа	119
3.5.2 Мутация PSEN1ΔE9 увеличивает TRPC6-зависимый депо-управляемый вход кальция в дендритных шипиках в гиппокампальных культурах	121
3.5.3 Соединение EVP4593 предотвращает увеличение амплитуды постсинаптического нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах гиппокампа, экспрессирующих PSEN1ΔE9.....	123
3.5.4 Соединение EVP4593 увеличивает процент грибовидных шипиков в культуре гиппокампа экспрессирующей PSEN1ΔE9	125
Глава 4 Обсуждение результатов	129
4.1 Нарушения регуляции транспорта кальция депо-управляемыми кальциевыми каналами, как при гипо-, так и гиперактивации, ведут к снижению стабильных грибовидных шипиков в гиппокампе	129
4.2 Манипуляция уровнем экспрессии белка STIM2 в гиппокампе мышей демонстрирует терапевтический эффект	130
4.3 Потенциальные фармакологические агенты на основе активаторов TRPC6 каналов	132
4.4 Потенциальные терапевтические агенты на основе блокаторов TRPC6 каналов .	135
Заключение.....	138
Выводы.....	139
Практические рекомендации	141
Список сокращений и условных обозначений.....	142
Список литературы.....	145

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Болезнь Альцгеймера (БА) - наиболее распространённая форма прогрессирующей деменции у людей пожилого возраста, в странах Евросоюза наблюдается у каждого 20-го европейца старше 65 лет. Объем финансирования лечения БА только в Европе составляет свыше 100 млрд. евро. Предполагается, что к 2040 году распространенность БА увеличится вдвое в странах Западной Европы, втрое – в странах Восточной Европы [6]. Распространенность БА в РФ имеет сходные показатели [5].

По этиологии БА можно разделить на две большие группы. Первая, более 95%, спорадическая, общим фактором риска для которой на сегодня может служить лишь преклонный возраст, и вторая, наследственная, составляющая лишь 1-2% случаев, вызываемая миссенс мутациями в белках пресенилинах и в белке предшественнике амилоида [22, 104, 106, 127].

Для лечения БА используются препараты, которые лишь временно снижают выраженность симптомов заболевания. Среди них - блокаторы ацетилхолинэстеразы - донепецил, галантамин и ривастигмин [121, 210], блокатор N-метил-D-аспартат глутаматных рецепторов (NMDA) мемантин [50], ограничивающий вход ионов кальция в цитозоль, защищая нейроны от эксайтотоксичности [193, 194].

В клинической практике блокаторы ацетилхолинэстеразы и мемантин часто применяются совместно для лечения легкой и умеренной форм БА [204]. Однако существенно замедлить развитие заболевания эти препараты не способны. Поэтому совершенствование фармакотерапии БА является одним из приоритетов мировой фармакологии.

Разработка эффективных средств патогенетической терапии БА требует дополнения представлений о механизмах, лежащих в основе нейродегенерации, с оценкой нейрохимических и морфологических различий в изменениях нейронов при нормальном старении и при развитии деменции. Очевидная мультифакториальность спорадической формы БА определяет необходимость дальнейших исследований, в том числе, фармакогенетических, для анализа молекулярных основ заболевания, а именно, обнаружения нарушений в процессах, определяющих изменения физиологических функций нейронов. На этой основе представляется возможным выявить фармакологические мишени, регуляция которых обеспечит терапевтический эффект.

Основным токсическим агентом при БА первоначально рассматривался β амилоид [228]. В экспериментальных исследованиях была установлена эффективность амилоид-специфичных

антител. Однако в клинике (Eli Lilly & Co.) препараты на основе моноклональных IgG1 антител к растворимым формам бета-амилоида (Solanezumab) не улучшали когнитивные функции пациентов с БА [56, 116], что обусловило целесообразность поиска других факторов, возможно предшествующих накоплению β амилоида.

Отличительной чертой БА является медленное развитие с потерей сначала краткосрочной и позднее долгосрочной памяти. Исходя из представлений о формировании памяти при образовании устойчивых синапсов, БА можно рассматривать как следствие синаптической дисфункции [227]. Установлена корреляция между изменениями дендритных шипиков в области CA1 гиппокампа и нарушениями памяти в моделях БА [16, 243]. Показано, что синаптическая утрата отличает пациентов с деменцией и коррелирует с тяжестью деменции [63, 225, 251]. Принимая потерю синапсов в качестве ключевого элемента патогенеза БА, можно полагать, что их восстановление или ограничение утраты является основной стратегией фармакотерапии БА.

В качестве ключевых механизмов старения мозга рассматривается кальциевая гипотеза [134], предполагающая, что нарушение кальциевого гомеостаза предшествует появлению амилоидных бляшек, нейрофибриллярных клубков и массовой гибели нейронов. При этом образование амилоидных бляшек в свою очередь негативно влияет на кальциевые каналы и другие элементы сигнальных систем [26, 67, 171, 244].

Нарушение Ca^{2+} гомеостаза при нарушении функций кальций-проницаемых белков, таких как ионные каналы плазматической мембраны (NMDAR, AMPAR, VGCC), ионные каналы внутриклеточных депо ЭПР (RyanR, InsP3R), депо-управляемые каналы (TRPC6-зависимый) лежит в основе патогенеза БА [27, 40].

Отдельные клинические данные подтверждают возможность применения блокаторов потенциал зависимых кальциевых каналов (VGCC) L-типа, в частности нитрендипина, в качестве потенциальных препаратов предупреждающих развитие деменции альцгеймерского типа, сосудистой и смешанной, но не БА [85].

При доказанном участии в патогенезе БА обусловленной NMDAR глутаматной эксайтотоксичности [54, 260], мемантин не влияет на стабильность синаптических контактов [249]. NMDAR/AMPA/VGCC являются мощными кальций пропускающими каналами (для NMDAR проводимость для ионов кальция составляет 40-80 pS), изменение их активности не позволяет осуществлять тонкую настройку Ca^{2+} сигналинга [185]. Последняя необходима для коррекции малейших отклонений в кальциевом гомеостазе, с которыми связана деградация неправильно упакованных белков в ЭПР, сохранение энергетического баланса митохондрий и процессы апоптоза, поддержание стабильных синаптических контактов [243]. Потому поиск путей восстановления или предупреждения нарушений синаптических контактов путем

регуляции внутриклеточных кальций-пропускающих каналов на ЭПР, является актуальным и перспективным для создания средств патогенетической фармакотерапии БА.

Степень разработанности темы исследования

Основными каналами, обеспечивающими высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ЭПР, являются рианодиновые рецепторы (RyanR) и инозитолтрифосфатные рецепторы (InsP3R). Показаны нейропротекторные свойства модуляторов этих каналов – дантролена, ксестоспонгина С и 2-АРВ на моделях БА [28, 89, 166, 174]. Однако данные об эффективности дантролена при лечении БА неоднозначны [45, 196, 203, 286], как и специфичность ксестоспонгина С и 2-АРВ [73, 97, 236].

Установлена роль нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) как уникального клеточного механизма, обеспечивающего кальциевый гомеостаз [209]. На трансляционной модели БА, мышцах линии PS1-M146V-KI с заменой пресенилина 1 на мутантный (M146V) пресенилин 1 человека было показано, что снижение нДУВК в ответ на перегрузку кальцием депо ЭПР вызывает дестабилизацию дендритных шипиков [243]. В то же время широко распространенная в финской популяции мутация с делетированным девятым экзоном ($\Delta E9$) в PS1 приводит к сверхтекучести пресенилиновых пор, что ведет к снижению концентрации кальция в ЭПР [259]. В гиппокампальной нейрональной культуре Neuro2a установлено, что гиперэкспрессия PSEN1 $\Delta E9$ вызывает активацию ДУВК, а у мух дрозофил с гиперэкспрессией мутантного пресенилина показана потеря кратковременной памяти [220]. Таким образом, экспериментальные данные указывают на возможность нарушений как при сниженном, так и при повышенном нДУВК, что определяет направления поиска фармакологических средств как активаторов, так и ингибиторов нДУВК.

Установлено, что нДУВК регулируется через канал плазматической мембраны TRPC6 [287]. Ранее было выявлено соединение NSN21778, положительный модулятор TRPC6 [287], которое восстанавливало нДУВК в гиппокампе и защищало постсинаптические дендритные шипики от токсического действия мутантного пресенилина [287]. Однако неудовлетворительная фармакокинетика и биодоступность NSN21778 определили необходимость поиска других регуляторов TRPC6.

Свойства агонистов TRPC6 установлены у гиперфорина и соединения [4-(5-хлор-2-метилфенил)пиперазин-1-ил](3-фторфенил) метанон, однако они не перспективны для разработки в качестве фармакологических препаратов [70, 224, 271].

Таким образом, кальций-зависимые пути регуляции функций нейронов интенсивно изучаются. Однако выявление молекулярных мишеней и новых фармакологических структур, прицельно воздействующих на эти мишени, вызывающих стабилизацию синаптических контактов при БА, остается актуальным.

Цель исследования

Выявление фармакологических мишеней и регулирующих их базовых химических структур, перспективных для фармакологической разработки средств лечения болезни Альцгеймера, на основе анализа кальций зависимых процессов, включенных в патогенез заболевания

Задачи исследования

1. Исследовать роль кальциевой дисрегуляции в морфологических изменениях дендритных шипиков в гиппокампе на экспериментальных моделях амилоидной токсичности.
2. Доказать участие депо-управляемых кальциевых каналов в поддержании морфологии дендритных шипиков.
3. Установить взаимосвязь между активностью депо-управляемых кальциевых каналов и числом амилоидных бляшек в коре головного мозга трансгенных мышей – экспериментальных моделей болезни Альцгеймера.
4. Изучить молекулярный кальций-зависимый механизм дестабилизации дендритных шипиков на патогенетической модели болезни Альцгеймера, экспрессирующей мутантный PSEN1 Δ E9.
5. Обосновать фармакотерапевтическую целесообразность коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа на экспериментальных моделях болезни Альцгеймера.
6. Осуществить поиск фармакологически активных химических соединений - модуляторов нейронального депо-управляемого входа кальция.
7. Доказать нейропротекторную активность отобранных химических соединений в *in vitro* и *ex vivo* моделях амилоидной синаптотоксичности.
8. Определить молекулярную мишень базовых химических структур.

Научная новизна

Определены базовые химические структуры, воздействующие на молекулярную мишень – каналы TRPC6 по депо-зависимому пути.

На клеточной модели амилоидной синаптотоксичности установлен зависимый от концентрации нейропротекторный эффект соединений, производных пиперазина.

Показано, что соединение N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид является агонистом каналов TRPC6 в гиппокампальных клетках генетических моделей БА.

На генетической модели с гиперэкспрессией PSEN1 Δ E9 установлен нейропротекторный эффект соединения 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиназолин-4,6-диамина.

Впервые показано, что 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамина является антагонистом TRPC6-зависимого депо-управляемого входа кальция в нейронах гиппокампа.

Впервые положительный модулятор сигнального пути TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция - производное пиперазина – N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил) ацетамид - предложен в качестве базовой химической структуры, на основе которой возможна разработка фармакотерапии форм БА с избыточным содержанием кальция в эндоплазматическом ретикулуме.

Впервые антагонист молекулярного пути TRPC6-нДУБК, 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиназолин-4,6-диамина, предложен в качестве базовой химической структуры для разработки фармакотерапии форм БА с истощенными запасами кальция в эндоплазматическом ретикулуме.

Рекомендованные в настоящей работе соединения для фармакотерапии БА воздействуют на новую фармакологическую мишень – каналы TRPC6 в нейронах гиппокампа, активируемые по депо-зависимому пути. Существующие лекарственные средства для лечения пациентов с БА на данную мишень не влияют.

Теоретическая и практическая значимость работы

С использованием *in vitro* и *in vivo* моделей БА получены фундаментальные результаты, демонстрирующие, что изменения кальций-зависимых сигнальных путей TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция лежат в основе дестабилизации синаптических контактов. Доказано, что тонкая регулировка кальциевой сигнализации в постсинаптических

контактах позволяет ограничить развитие амилоидной токсичности и восстановить синаптическую пластичность в срезах мозга трансгенных мышей - модели БА.

Охарактеризованы свойства модуляторов депо-управляемых кальций-зависимых каналов, позволяющие рекомендовать их в качестве перспективных фармакологических препаратов лечения БА, обусловленной нарушением внутриклеточной регуляции кальция. Показано, что соединения - производные пиперазина - способны взаимодействовать с клеточной мишенью TRPC6-зависимым депо-управляемым кальциевым каналом в гиппокампе. Методами биоинформатики спрогнозирован минимальный набор их побочных эффектов, что обосновывает рекомендацию соединений для доклинических исследований.

Показано, что при изыскании фармакологических средств лечения болезни Альцгеймера, вызванной нарушением Ca^{2+} зависимого пути, фармакотерапевтические свойства могут быть выявлены как у агонистов, так и антагонистов депо-управляемых кальциевых каналов.

Таким образом, сформулирована новая стратегия фармакологической коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа и научно обоснована целесообразность разработки лекарственных средств патогенетической терапии фенотипов болезни Альцгеймера, обусловленных нарушением внутриклеточной кальциевой регуляции.

Разработанная *in vitro* модель амилоидной синаптотоксичности может быть использована для скрининга фармакологических соединений по критерию способности защищать синаптические контакты от амилоидной токсичности и регулировать кальций-зависимые пути в нейронах гиппокампа.

Методология и методы исследования

В качестве моделей БА использовали первичную культуру гиппокампа, обработанную синтетическими олигомерами амилоида-бета; первичную культуру гиппокампа, трансфецированную плазмидами, кодирующими экспрессию человеческого пресенилина 1 дикого типа, либо мутантного пресенилина 1 с делетированным 9м экзоном; трансгенную линию мышей 5xFAD; трансгенную линию мышей M-line-GFP с инъекциями олигомеров амилоида бета в гиппокамп. Индукцию долговременной потенциации изучали в срезах мозга мышей линии 5xFAD. Индукцию долговременной потенциации осуществляли с использованием TBS-протокола. Ишемию головного мозга моделировали на анестезированных животных методом односторонней окклюзии среднемозговой артерии по методу J. Koizumi. Для исследования влияния соединений на краткосрочную и долгосрочную память использовали поведенческий

тест «лабиринт Барнса». Эксперимент проводили на установке «Лабиринт Барнс для крыс» (ООО «НПК Открытая наука», Россия).

Применялась двухфотонная визуализация морфологии дендритных шипиков в срезах гиппокампа взрослых мышей и конфокальная визуализация процессов и структуры шипиков в культуре клеток. Изменения концентрации кальция в соме и дендритных шипиках нейронов после воздействия на клетки фармакологических агентов, либо экспрессии мутантных белков оценивали лазерной микроскопией. Для вирусной доставки генетического материала в гиппокамп взрослых мышей с помощью адено-ассоциированных вирусных векторов применяли стереотаксические операции. В исследовании использовали стандартные молекулярно-биологические методы: вестерн-блот, генотипирование, кальций фосфатную трансфекцию нейронов, иммуногистохимию, иммуноцитохимию. Биоинформатический анализ химических соединений выполнен с помощью программ PASS. Все результаты были обработаны релевантными методами статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Кальциевая дисрегуляция в нейронах гиппокампа дестабилизирует синаптические контакты при моделировании амилоидной токсичности.
- 2) При гипоактивности и гиперактивности депо-управляемых кальциевых каналов снижается количество синаптических контактов в гиппокампе.
- 3) Фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа является стратегией для разработки средств лекарственной терапии фенотипов болезни Альцгеймера, обусловленных нарушением Ca^{2+} зависимых сигнальных путей.
- 4) Каналы TRPC6 в составе депо-управляемых кальциевых каналов являются молекулярной мишенью для разработки фармакологических средств лечения болезни Альцгеймера при нарушенной кальциевой регуляции в нейронах.
- 5) Соединения модуляторы (производные пиперазина/ этаноламина /хиназолиндиамина) TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция в гиппокампе перспективны для разработки фармакологических средств лечения болезни Альцгеймера.
- 6) Для разработки средств лечения разных форм болезни Альцгеймера целесообразно использовать как агонисты, так и антагонисты депо-управляемых кальциевых каналов.

Степень достоверности полученных результатов

Все научные положения и выводы обоснованы благодаря системному анализу проблемы; использованию современных методов фармакологии и молекулярной биологии, а также нейробиологии и электрофизиологии; должной выборке экспериментальных образцов (культуры клеток, срезы мозга, животные) в соответствии с обозначенными задачам; достаточному количеству полученных экспериментальных данных; применению соответствующих методов статистического анализа.

Апробация результатов

Основные положения работы были доложены и обсуждены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: AD/PD 2013 (Флоренция, 2013); Неделя науки СПбПУ 2015 (Санкт-Петербург, 2015); AD/PD 2015 (Ницца, 2015); V Съезд биофизиков России 2015 (Ростов-на-Дону, 2015); Международный форум «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2016); V European congress of preventive, regenerative and anti-aging medicine (Санкт-Петербург, 2016); Неделя науки СПбПУ 2016 (Санкт-Петербург, 2016); Gordon Research Conference on Neurobiology of Brain Disorders 2016 (Жирона, 2016); AD/PD 2017 (Вена, 2017); Неделя науки СПбПУ 2017 (Санкт-Петербург, 2017); VI Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2017); International Symposium. Experts' opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology (Женева, 2017); 11th FENS Forum of Neuroscience (Берлин, 2018); Неделя науки СПбПУ 2018 (Санкт-Петербург, 2018); VI Съезд физиологов СНГ (Дагомыс, 2019).

Личный вклад соискателя

Основные научные результаты по теме исследования получены лично соискателем. Совместно с научным консультантом определены цели, задачи, объем исследования, его этапы и направления. Автором самостоятельно разработаны протоколы и схемы экспериментов, сформированы экспериментальные группы. Соискатель осуществляла подробную работу с литературой, готовила экспериментальные образцы, вела колонии трансгенных мышей, забор биологического материала, анализ биологических образцов и интерпретацию полученных

данных. Участие соискателя в исследовательской работе представлено в опубликованных и реферируемых научных трудах.

Личный вклад соискателя при выполнении экспериментальных исследований составил от 50 до 100%, в подготовку докладов и публикаций в соавторстве – 60-90%.

Индекс Хирша автора диссертации по результатам 2021 года - 15 (по базе данных Web of Science(Publons)), 15 (по базе данных Scopus), 11 (по базе данных РИНЦ).

Внедрения в практику

Разработанная *in vitro* модель амилоидной синаптотоксичности была использована в качестве скринингового эссе на обнаружение нейропротекторных свойств у потенциальных лекарственных препаратов. Также данная модель может быть использована для изучения механизма действия химических соединений, в частности для изучения способности фармакологических агентов защищать синаптические контакты от амилоидной токсичности, а также для проверки влияния соединений на кальциевую регуляцию в нейронах гиппокампа.

При успешном прохождении, обнаруженными в ходе диссертационного исследования, модуляторами кальций-зависимых каналов преклинических и клинических испытаний на фармацевтическом рынке появится первый лекарственный препарат замедляющий развитие БА.

Области применения полученных результатов: фармакология, молекулярная нейробиология, медицина и фармацевтика.

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в учебный процесс магистратуры высшей школы биомедицинских систем и биотехнологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (лекции по дисциплинам «Нейробиология» и «Прикладная нейробиология» для студентов магистров).

Публикации

По результатам работы опубликовано 14 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS – 13, Scopus – 14), 4 статьи в журналах, входящих в РИНЦ, 1 глава в монографии. Получен 1 патент.

Результаты представлены в 15 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011, изложена на 168 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 297 источников (6 отечественных и 291 иностранных).

Диссертационная работа иллюстрирована 5 таблицами, 43 рисунками.

Ссылки и список литературы оформлены при использовании программы EndNote X5 и автоматическим подключением ГОСТ 7.0.5.-2008 (GOST-Russian 2008 (Numeric)).

Финансовая поддержка работы

Эксперименты в рамках данной работы проведены при поддержке грантов:

- Грант РФФИ № 14-25-00024 тема проекта: "Исследование молекулярных механизмов кальциевой сигнализации при нейродегенеративных заболеваниях" (2014-2018 гг.) (Соискатель – основной исполнитель).
- Грант гос задание № 17.1360.2014/К тема проекта: "Исследование роли кальциевой сигнализации в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и поиск терапевтических агентов» (2017-2019 гг.) (Соискатель – основной исполнитель).
- Грант частного российского фонда "Династия" тема проекта: «Внутриклеточный кальциевый сигналинг и синаптическая дисфункция при болезни Альцгеймера» (2013-2015 гг.) (Соискатель – руководитель).
- Грант РФФИ 17-04-00710 А (Конкурс А) тема проекта: «Роль нейронального кальциевого сигналинга в потере синапсов при болезни Альцгеймера» (2017-2018 гг.) (Соискатель – руководитель).
- Грант Президента РФ для молодых к.н. Договор №14.У30.17.1043-МК тема проекта: «Биофизическое исследование роли сигма 1 рецептора в патогенезе болезни Альцгеймера» (2017-2018 гг.) (Соискатель – руководитель).
- Грант РФФИ № 18-74-00027 тема проекта: «Исследование внутриклеточных механизмов кальциевой дисрегуляции при болезни Альцгеймера» (2018-2020 гг.) (Соискатель – руководитель).

- Грант РФФИ № 20-75-10026 тема проекта: «Модуляторы нейронального кальциевого сигналинга перспективные фармакологические агенты для лечения патогенетических форм болезни Альцгеймера» (2020-2022 гг.) (Соискатель – руководитель).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность:

- д.б.н., профессору, заведующему лабораторией молекулярной нейродегенерации СПбПУ, научному консультанту Илье Борисовичу Безпрозванному за бесценную помощь в обсуждении научных результатов, в выборе направления исследований, подготовке научных публикаций мирового уровня, за возможность самостоятельной реализации научных идей;
- д.физ.-мат.н., профессору, директору НОЦ ФОМБТ СПбПУ, директору Высшей школы биомедицинских систем и биотехнологий Власовой Ольге Леонардовне за неоценимый вклад в развитие научного мышления автора, за поддержку и веру в талантливых молодых ученых;
- аспиранту СПбПУ Чернюк Дарье Павловне и к.физ.-мат.н. Пчицкой Екатерине Игоревне за совместную работу в области нейробиологии и физиологии, за помощь в организации и реализации исследовательской деятельности, анализе полученных данных и подготовки рукописей к публикации в реферируемых научных журналах;
- коллективу ЛМН СПбПУ за помощь в освоении экспериментальных протоколов и проведении экспериментов;
- к.физ.-мат.н. Плотниковой Полине Владимировне и к.б.н. Большаковой Анастасии Викторовне за административную помощь;
- коллективу Высшей школы биомедицинских систем и биотехнологий СПбПУ за помощь в подготовке, представлении и обсуждении диссертации;
- родителям, мужу, детям и друзьям за их бесконечное доверие, любовь, терпение и поддержку.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Болезнь Альцгеймера (БА) является возрастным заболеванием головного мозга, которое вызывает прогрессирующую нейродегенерацию преимущественно в таких областях головного мозга как кора и гиппокамп. Основными признаками БА являются постепенно нарастающее ухудшение памяти и накопление фибриллярных амилоидных бляшек в мозге пациента. БА имеет две формы: спорадическая БА (сБА) с мало изученными причинами возникновения и наследственная БА (нБА), вызываемая генетически наследуемыми мутациями либо в белке предшественнике амилоида (APP), либо в белках пресенилин 1 (PS1) или пресенилин 2 (PS2) [22, 104, 106, 127]. Основным фактором риска развития БА является преклонный возраст. Первые симптомы нБА начинают появляться у пациентов в возрасте около 50 лет. В случае сБА первые симптомы появляются в гораздо более старшем возрасте, около 70 лет и позже. нБА это небольшая доля от общего числа случаев БА - примерно 1-2%. Основные факторы риска для развития сБА - пожилой возраст (старше 70 лет) и экспрессия генов Аполипротеина Е (АроЕ) $\epsilon 4$ [55, 241]. Изоформы АроЕ влияют на клиренс, агрегацию и метаболизм амилоида-бета $A\beta$ [41, 135, 263]. Было обнаружено, что аллель АроЕ $\epsilon 2$ является нейропротекторной [23]. Среди других генетических факторов риска мутации в гене TREM2, которому в последнее время уделяется все больше внимания из-за появления данных о сиквенсе всего генома человека. Показано, что TREM2 исключительно экспрессируется микроглией в мозге мышей и человека [84]. Точная роль TREM2 в патогенезе БА не ясна, возможно, TREM2 участвует в регуляции иммунной системы мозга [120]. Информация о мутациях вызывающих нБА используются для создания трансгенных животных, преимущественно мышей, трансляционных моделей БА. С момента проявления симптомов сБА и нБА их патогенез схож. Существует надежда, что успешное лечение нБА может привести к созданию релевантной для сБА терапии. Будущие фундаментальные и прикладные исследования, а также клинические испытания помогут ответить на этот вопрос.

Существуют различные гипотезы патогенеза БА: первой было описана – холинергическая [21], доминирующей является амилоидогенная гипотеза [105], наиболее популярной в настоящее время является тау гипотеза [143]. Недавно амилоидогенная гипотеза была преобразована в гипотезу олигомеров или гипотезу растворимого $A\beta$ [81]. Она отличается от классической амилоидогенной гипотезы тем, что проксимальными нейротоксинами при БА являются растворимыми олигомеры $A\beta$, а не $A\beta$ в форме амилоидных агрегатов. Однако до сих пор ни одна из упомянутых выше гипотез не принесла успешных фармацевтических препаратов для предотвращения развития БА. Относительно недавно кальциевая гипотеза БА начала набирать

популярность. Согласно данной гипотезе утверждается, что нарушенная передача кальций-зависимых сигналов вследствие неправильного общения нейронов происходит на ранних стадиях заболевания и является ключевым событием запускающим синаптическую дисфункцию и нейродегенерацию [40]. Разработка новых мощных и точных методов визуализации кальциевых осцилляций позволили провести обширные исследования в этой области и породили новые интригующие данные. Текущий обзор посвящен описанию внутриклеточных кальций-зависимых сигнальных путей, нарушенных при БА, с особым акцентом на кальциевые каналы ЭПР и депо-управляемый вход кальция. Основываясь на кальциевой гипотезе нейродегенеративных заболеваний предлагается и обсуждается применимость новых клеточных мишеней для разработки лекарственной терапии БА.

1.1 Кальциевая гипотеза болезни Альцгеймера

В качестве ключевых механизмов старения мозга рассматривается кальциевая гипотеза [134], предполагающая, что нарушение кальциевого гомеостаза предшествует появлению амилоидных бляшек, нейрофибриллярных клубков и массовой гибели нейронов. При этом образование амилоидных бляшек в свою очередь негативно влияет на кальциевые каналы и другие элементы сигнальных систем [26, 67, 171, 244].

Нарушение Ca^{2+} гомеостаза при нарушении функций кальций-проницаемых белков, таких как ионные каналы плазматической мембраны (NMDAR, AMPAR, VGCC), ионные каналы внутриклеточных депо ЭПР (RyanR, InsP3R), депо-управляемые каналы (TRPC6-зависимый), а также через митохондриальную пору лежит в основе патогенеза БА [27, 40].

Митохондрии могут формировать внутриклеточную передачу кальциевых сигналов, главным образом через Ca^{2+} секвестрирующий механизм [213]. Поглощение Ca^{2+} митохондриями играет важную роль в физиологии нейронов путем стимуляции митохондриального метаболизма и увеличения производства митохондриальной энергии. Чрезмерное проникновение Ca^{2+} в митохондрии может привести к открытию переходной поры проницаемости (PTP) и может привести к апоптозу [238]. Как изменяются сигнальные пути проникновения кальция в клетку в процессе развития БА будут обсуждаться в разделах настоящей главы ниже.

Первые симптомы болезни Альцгеймера начинают появляться у пациентов со сБА в возрасте от 70 до 80 лет. Для генетически наследуемой формы БА первые симптомы могут появиться уже в 50 лет. Человеческий мозг имеет защитные механизмы, которые борются с болезнью до достижения человеком среднего возраста или позже. Однако с возрастом емкость таких механизмов снижается, и в определенный момент мозг уже не способен противостоять БА.

Потеря способности справляться с избытком или недостатком ионов Ca^{2+} является одной из особенностей старения нейронов. В экспериментальных моделях Ca^{2+} накапливается внутри нейронов и его внутриклеточная концентрация постепенно увеличивается [27, 40]. Повышенные уровни кальция оказываются токсичными для клеток и вызывают последующие патологические процессы, которые управляют патогенезом БА. Каковы причины для увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при БА? Существует ли основной механизм дисрегуляции Ca^{2+} при БА или это следствие нескольких идущих друг за другом событий, которые приводят к развитию БА? Существуют ли терапевтические агенты, которые могут нормализовать Ca^{2+} -зависимую сигнальную систему при БА? Цель кальциевой гипотезы ответить на эти и многие другие связанные вопросы.

1.2 Молекулярно-биологические основы кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа при БА

1.2.1 Роль бета-амилоида в регуляции кальциевого сигналинга в нейронах

Бета-амилоид ($\text{A}\beta$) с момента его открытия был признан основным токсическим агентом при БА [228]. В настоящее время теория бета-амилоида находится на пересмотре [114, 176]. Очевидно, что бета-амилоид играет важную роль в патогенезе БА, но и другие факторы также способствуют возникновению и развитию патологии БА вместе с бета-амилоидом или даже могут предшествовать бета-амилоидной токсичности. Токсическое влияние олигомеров $\text{A}\beta$ на нейроны было тщательно изучено, и многие публикации продемонстрировали, что агрегаты $\text{A}\beta$ способствуют увеличению концентрации Ca^{2+} в цитозоли нейронов [30, 65-67, 69, 96, 144, 232, 267] (Рисунок 1).

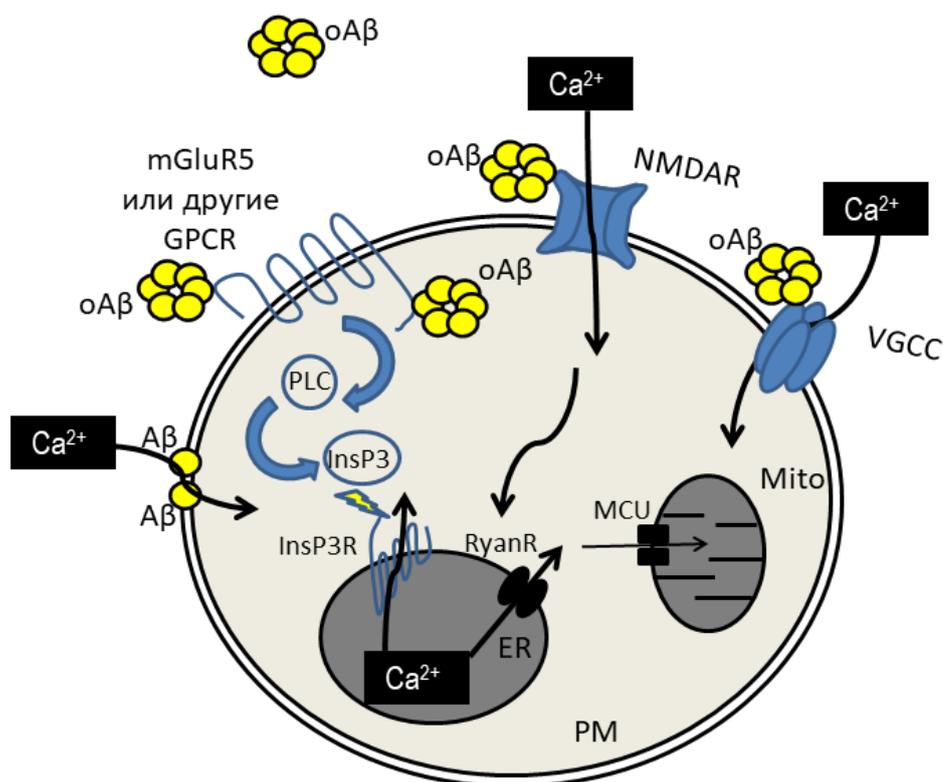


Рисунок 1 Молекулярные пути повышения концентрации цитозольного Ca^{2+} бета-амилоидом

Бета-амилоид имеет несколько партнеров по взаимодействию на плазматической мембране (PM). Среди них NMDAR, VGCC и mGluR5. Взаимодействие с NMDAR и VGCC приводит к входу ионов Ca^{2+} из внеклеточного пространства. Взаимодействие с mGluR5 или с другими связанными с G-белком рецепторами (GPCR) приводит к выработке инозитол трифосфата (InsP3), который усиливает высвобождение Ca^{2+} через InsP3R из ЭПР в цитозоль. Кроме того, бета-амилоид способен встраиваться в мембрану образуя Ca^{2+} -проницаемые каналы. Увеличение Ca^{2+} в ЭПР потенцирует Ca^{2+} -зависимый выброс кальция через RyanR. Этот выброс Ca^{2+} через RyanR играет роль во входе Ca^{2+} в митохондрии (mito) через унипортер митохондриального канала (MCU).

Точный механизм $\text{A}\beta$ -опосредованного нарушения кальциевого гомеостаза активно исследуется. Касательно роли бета-амилоида в Ca^{2+} дисрегуляции при БА, было замечено, что бета-амилоид может сам по себе формировать Ca^{2+} проницаемые каналы в плазматической мембране [15] (Рисунок 1). Вероятно, наиболее важной клеточной мишенью бета-амилоида являются рецепторы NMDA. Активация NMDA-рецепторов является ключевым событием в феномене инициации долговременной потенциации (ДВП), основного клеточного процесса ответственного за формирование памяти. Влияние бета-амилоида на NMDA рецепторы было тщательно изучено [86, 179, 290]. В частности, было показано, что бета-амилоид способен

повышать уязвимость нейронов к эксайтотоксичности, вызванной чрезмерной активацией NMDA рецепторов с последующей перегрузкой кальцием клеток [172, 173]. Некоторые данные указывают на то, что бета-амилоид в его олигомерной форме может непосредственно связываться и модулировать активность NMDA-рецепторов [60, 149, 233, 252]. Существуют данные указывающие на то, что NMDAR необходимы для синаптического нацеливания олигомеров A β , но они, по-видимому, не являются сайтами связывания для олигомеров A β [62]. В литературе встречаются описания различных взаимодействий A β и NMDAR. Сообщалось, что на ранних стадиях заболевания A β активирует NMDAR и индуцирует быстрое повышение Ca $^{2+}$ в нейронах [80, 197, 219, 290]. Использование олигомеров A β в сублетальной концентрации вызывают длительную передачу сигналов Ca $^{2+}$ через NMDAR (Рисунок 1). Эти длительные Ca $^{2+}$ сигналы запускают редокс-чувствительную стимуляцию RyanR-опосредованного высвобождения Ca $^{2+}$ из ЭПР, снижение экспрессии белка RyanR2, митохондриальную фрагментацию и предотвращение RyanR-опосредованного ремоделирования шипиков [199]. Токсическое влияние олигомерного A β на RyanR-опосредованную передачу Ca $^{2+}$ сигналов в ЭПР также наблюдалась в глии, особенно в культивируемых астроцитах [10]. В исследовании Гавелло и коллег олигомерный A β 42 по-разному регулирует функции RyanR, NMDAR и VGCCs путем увеличения высвобождения Ca $^{2+}$ через RyanRs и ингибирования входа Ca $^{2+}$ через NMDAR и VGCC. Согласно этому исследованию увеличение внутриклеточной концентрации Ca $^{2+}$ вызывало стимуляцию калиевого тока, проводимого Ca $^{2+}$ -активируемыми калиевыми каналами высокой проводимости (BK каналы) и ингибирование возбуждения нейрональной сети гиппокампа [93]. Воздействие олигомерными формами A β *in vivo* вызывает быстрое повышение уровня Ca $^{2+}$ в покое, что зависит от уровня активации NMDAR и запускает потерю дендритных шипиков [13]. Лечение с использованием Адуканумаба (антитело против A β) восстанавливало гомеостаз кальция у мышей линии Tg2576 [130]. Вероятно эффект лечения был связан с восстановлением функции NMDAR, а не с восстановлением внутриклеточной передачи Ca $^{2+}$ сигналов. Дополнительно сообщалось, что A β индуцирует снижение экспрессии NMDAR и усиливает его эндоцитоз [234], ухудшает NMDAR-зависимую ДВП [58] и уменьшает NMDAR-опосредованный вход кальция в синаптически активные шипики [229].

Другими проницаемыми для кальция каналами плазматической мембраны являются пресинаптические VGCC (Рисунок 1). Было отмечено, что олигомеры A β уменьшают синаптическую передачу между нейронами гиппокампа, скорее всего, через снижение потока Ca $^{2+}$ через кальциевые каналы P/Q-типа [191]. Однако в клетках НЕК293, которые сверхэкспрессируют рекомбинантные кальциевые каналы P/Q-типа наблюдается увеличение токов P/Q-типа вызванные олигомерами A β [112]. Авторы объясняют такие различия тем, что ионные каналы могут быть двунаправленными и могут по разному регулироваться одной и той

же молекулой. Например, блокатор калиевых каналов к-конотоксин PVIIA усиливает и уменьшает токи калия в зависимости от его состояния активации [139]. С другой стороны, авторы сообщают, что блокировка постсинаптического кальциевого канала L-типа 10 мкМ нимодипином не устраняли вызванные A β 42 дефекты, указывая на то, что патология олигомеров A β специфически опосредуется через пресинаптические ионные каналы. В отличие от результатов, упомянутых выше, есть данные о возрастной положительной регуляции VGCC L-типа в области CA1 гиппокампа у мышей 3xTg [269]. Сообщалось, что антагонисты L-VGCC могут защищать нейроны и сохранять синаптическую функцию в животных моделях старения и БА [12, 157, 198, 214, 262].

Помимо действия бета-амилоида на кальциевые каналы располагающиеся на плазматической мембране, было показано, что как внеклеточное, так и внутриклеточное воздействие бета-амилоидом изменяет активность ЭПР-резидентных кальциевых каналов - RyanR и InsP3R [82, 122]. RyanR- и InsP3R-опосредованные Ca²⁺ ответы индуцировались путем воздействия A β (25-35) и A β 40 на культивируемые кортикальные нейроны. Было показано, что A β 42-индуцированное высвобождение Ca²⁺ из ЭПР в интактные клетки человеческой нейробластомы были частично опосредованы InsP3R, тогда как большая часть Ca²⁺ высвобождалась за счет InsP3R-независимого механизма [122]. Интересно, что снижение RyanR-опосредованного высвобождения Ca²⁺ приводит к снижению внутриклеточного и внеклеточного A β у мышей, экспрессирующих APP (swe) (Tg2576) [196].

По словам Стутзмана, это пример предполагаемого патогенного цикла прямой связи, в котором повышенные уровни Ca²⁺, запускаемые бета-амилоидом, дополнительно способствуют выработке A β [38]. Связь между внеклеточным A β и внутриклеточными каналами все еще неясна, но было предложено несколько возможных механизмов действия. Было показано, что олигомеры A β индуцируют продукцию InsP3 посредством стимуляции и димеризации синаптических рецепторов mGluR5 [212]. Другая возможная связь заключается в том, что в дендритных шипиках Ca²⁺ высвобождаемый через RyanR может быть вызван A β -стимулированным входом Ca²⁺ через NMDAR [38, 95, 199]. Исследования СанМартин и коллег продемонстрировали, что олигомеры A β способствуют RyanR2-опосредованному высвобождению Ca²⁺ из ЭПР, поступлению Ca²⁺ в митохондрии, генерации АФК и фрагментации митохондриальной структурной сети. Далее было показано, что нокдаун RyanR2, а также использование антиоксидантов снижает Ca²⁺-зависимое токсическое действие олигомеров A β на митохондриальную функцию [222, 223]. Некоторые модели БА демонстрируют внутриклеточное накопление A β , который также может участвовать в дестабилизации кальциевого сигналинга в ЭПР [123]. Внутриклеточное введение олигомеров A β в ооциты *Xenopus* стимулирует G-белок-опосредованную продукцию InsP3 и последующее цитотоксическое высвобождение Ca²⁺ из ЭПР

[66]. Другое исследование показало, что InsP3R не требуется для A β 42-зависимого высвобождения Ca²⁺ из ЭПР в пермеабилзированной клеточной линии В-лимфоцитов цыпленка DT40, указывая на то, что существует альтернативный механизм действия A β 42 на ЭПР [122].

1.2.2 Роль пресенилинов в регуляции кальциевого сигналинга в нейронах

Пресенилины действуют как каталитическая субъединица гамма-секретазы. нБА-ассоциированные мутации нарушают гамма-секретазную функцию пресенилинов, приводя к амилоидогенному пути расщепления APP и производству токсичных видов бета-амилоида (Рисунок 2) [128].

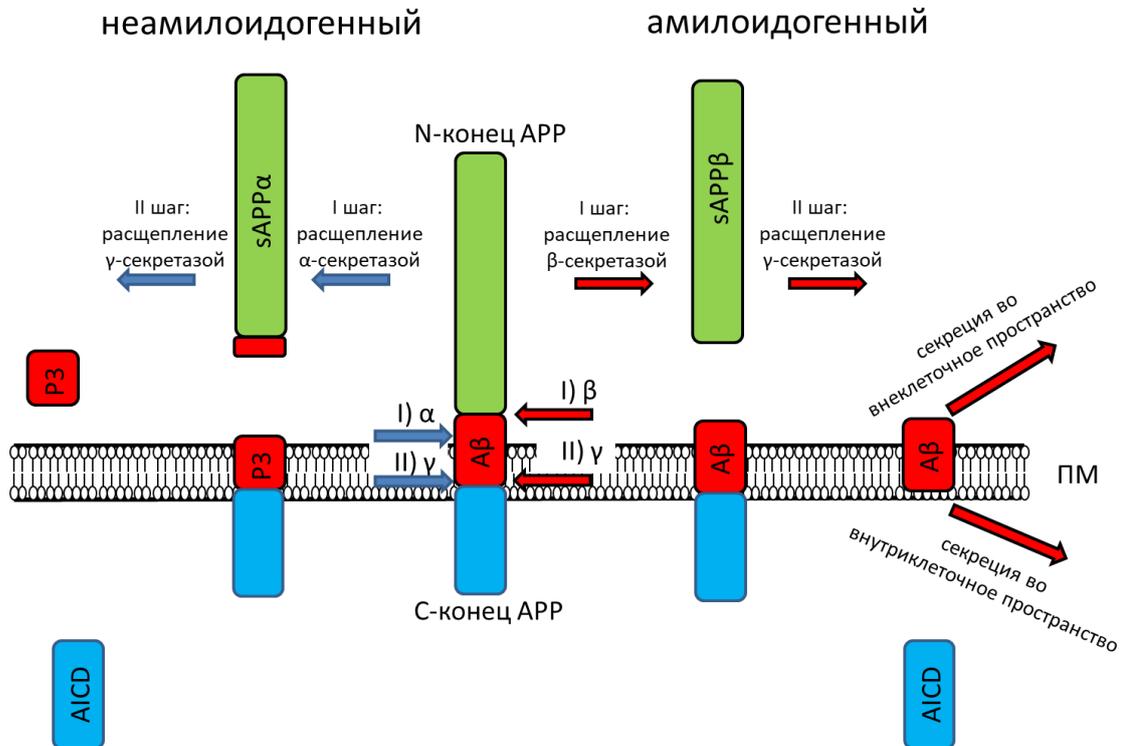


Рисунок 2 Молекулярные пути протеолиза APP в нейронах

APP расщепляется с помощью α (альфа)-, β (бета)- и γ (гамма)-секретаз. В неамилоидогенном пути α -секретаса первой расщепляет APP, что приводит к образованию растворимого фрагмента APP (sAPP α), P3 и внутриклеточного домена APP (AICD). Хотя роль P3 точно не изучена, sAPP α и AICD играют важные физиологические роли в нейронах [176]. В амилоидогенном пути сначала β -секретаса расщепляет APP, продуцируя растворимый внеклеточный фрагмент APP (sAPP β) и трансмембранный С-концевой фрагмент APP (APP-CTF). APP-CTF дополнительно расщепляется γ -секретазой, приводя к образованию бета-амилоида (A β) и AICD.

Вызывают ли нБА мутации усиление или ослабление гамма-секретазной функции пресенилинов является предметом споров в научном сообществе [264, 276, 277]. Разработка модуляторов гамма-секретазы в качестве потенциальной терапии от БА осложнена из-за существенной роли гамма-секретазы в расщеплении белка Notch [61]. Недавно было предложено несколько модуляторов гамма-секретазы, которые снижают содержание A β 42, но не ингибируют гамма-секретазо-опосредованный протеолиз Notch или накопление С-концевого фрагмента APP [266]. В 2019 году были опубликованы крио-ЭМ структуры комплексов гамма-секретазы вместе с Notch [279] и APP [295] демонстрирующие небольшие различия в сайтах связывания APP и Notch, что делает трудным (хотя возможным) разработку специфических модуляторов гамма-секретазы, которые бы блокировали только токсичное расщепление APP. Внутриклеточный домен APP (AICD) также влияет на высвобождение Ca²⁺ из ЭПР, регулируя экспрессию генов, вовлеченных в Ca²⁺ гомеостаз [153].

Значительный объем исследований показывает, что мутации в пресенилинах, наблюдаемые при нБА вызывают нарушение кальциевой регуляции независимо от их гамма-секретазной функции и накопления бета-амилоида, а изменяют активности RyanR и InsP3R [38, 48]. Были обнаружены up-регуляция RyanR-опосредованного высвобождения Ca²⁺ и повышение уровня экспрессии RyanR среди различных моделей БА, экспрессирующих мутантные пресенилины [38, 46, 47, 49, 64, 95, 242]. Было предложено, что пресенилины изменяют воротный механизм RyanR путем прямого межбелкового взаимодействия с N-концевым цитозольным доменом пресенилинов [109, 200, 221]. Влияние PS1 и PS2 на функции RyanR изоформ-специфично [200]. Увеличение отношения PS2 к PS1 наблюдалось у нормальных стареющих мышей как в мозжечке, так и в переднем мозге, что коррелировало с потерей пространственной памяти, обучения и двигательной функции [126]. Предполагается, что такой дисбаланс в пропорциях гомологов способствует возрастному увеличению в цитозольном уровне Ca²⁺ [38]. На основании этих результатов было высказано предположение, что избыточное высвобождение Ca²⁺ из ЭПР и повышенная концентрация Ca²⁺ в цитозоле, наблюдаемые во время БА, могут быть результатом изменения взаимодействий RyanR с пресенилинами [200]. Было предложено, что изменения в функциях RyanR, вызванные пресенилинами могут быть ответственны за изменения синаптической активности нейронов [272].

Чувствительность InsP3R к его агонисту InsP3 значительно повышается в клетках экспрессирующих мутантные пресенилины [52, 53]. Подавление экспрессии InsP3R1 нормализовало повышенную концентрацию Ca²⁺ в цитозоле, наблюдаемую в кортикальных и гиппокампальных нейронах в нокиновой мышечной модели PS1-M146V-KI и мышцах линии 3xTg, указывая на то, что InsP3R может быть потенциальной терапевтической мишенью [231].

Недавнее исследование с использованием компьютерного моделирования продемонстрировало более глубокое понимание воротного механизма InsP3R в присутствии мутантных пресенилинов [169]. Эта модель предсказала, что в присутствии нБА-вызывающих мутаций в PS у InsP3R появляется чувствительность как к InsP3, так и к Ca^{2+} , при этом для стимуляции InsP3R достаточно очень низкой концентрации InsP3. Следовательно, повышенная активность InsP3R при концентрациях InsP3 наблюдаемых в состоянии покоя должна приводить к спонтанным Ca^{2+} сигналам в клетках [169]. Используя вычислительную модель, та же исследовательская группа предположила, что мутации в пресенилинах могут увеличивать вероятность открытия митохондриальной поры переходной проницаемости, которая в свою очередь запускает патологические процессы и может вызвать гибель клеток [256]. Было предположено, что мутированный пресенилин усиливает высвобождение Ca^{2+} через InsP3R в цитоплазматический микродомен, образованный соседним кластером каналов InsP3R и унипортером митохондриального канала (MCU), и, следовательно, способствуют поглощению кальция митохондрией [256]. Данное исследование предполагает прямую связь между изменением в Ca^{2+} сигналинге и нарушением митохондриальной функции, наблюдаемой при БА.

Относительно недавно была предложена дополнительная независимая от гамма-секретазы функция пресенилинов. Было показано, что пресенилин 1 и пресенилин 2 действуют как пассивные каналы утечки кальция из ЭПР [188, 259, 286]. Изначально данная гипотеза считалась противоречивой [230], но она была поддержана непредвзятым поиском каналов утечки Ca^{2+} из ЭПР [20]. Данная функция PS1 изменяется многими, но не всеми нБА-ассоциированными мутациями (Рисунок 3). Например, широко изученная мутация M146V является классическим примером мутации PS1, которая вызывает снижение функции пассивного канала утечки Ca^{2+} из ЭПР [259]. Однако широко распространенная среди финской популяции мутация с делетированным девятым экзоном в PS1 делает пресенилиновые поры ЭПР сверхтекучими [259]. Была также обнаружена корреляция между клиническими фенотипами пациентов и влиянием нБА мутаций на функцию утечки Ca^{2+} из ЭПР [186]. Для картирования потенциальной поры, проницаемой для ионов кальция в PS1 использовали сайт-направленный мутагенез [187]. Было показано, что положение D385, но не положение D257, существенно для поддержания функции канала пресенилинов [187, 259]. Интересно, что пресенилины имеют сходства с хлоридными каналами [253], а кристаллическая структура высокого разрешения гомолога пресенилина PSH1 (семейство простейших) имеет отверстие, которое проходит через весь белок и достаточно велико, чтобы позволить прохождение ионов Ca^{2+} [158]. Однако это отверстие не было обнаружено при решении структуры комплекса гамма-секретазы [18]. Протеолитически расщепленный пресенилин не образует каналы утечки Ca^{2+} из ЭПР [259], что может объяснить отсутствие отверстия (поры) ионной проводимости в зрелом комплексе гамма-секретазы.

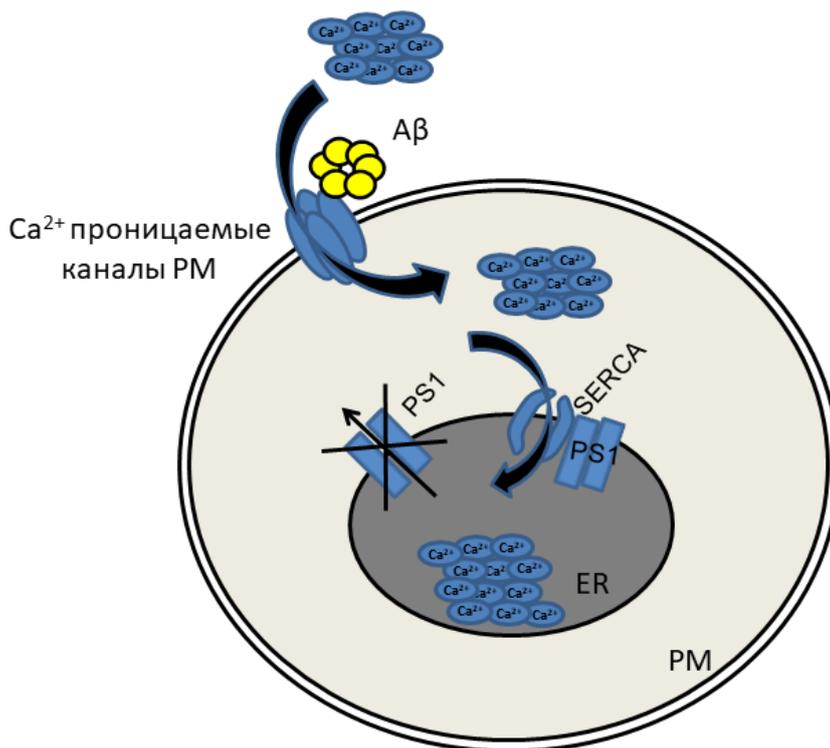


Рисунок 3 Пресенилин 1 зависимый внутриклеточный сигнальный путь, участвующий в перенасыщении кальцием депо ЭПР при БА

Возможные механизмы, участвующие в перенасыщении кальцием депо ЭПР при БА. 1) нБА-ассоциированные мутации вызывают нарушение функции пресенилинов в качестве пассивных каналов утечки Ca^{2+} , вызывая тем самым накопление Ca^{2+} в полостях ЭПР; 2) Аβ встраивается в плазматическую мембрану образуя Ca^{2+} -проницаемые каналы, либо взаимодействует с Ca^{2+} -проницаемыми каналами PM, повышая концентрацию Ca^{2+} в цитозоли клетки; 3) PS1 может взаимодействовать с SERCA насосом через прямое белок-белковое взаимодействие, таким образом, усиливая его насосную активность.

Используя молекулярно-динамический подход, недавно была опубликована динамическая полная атомная модель зрелого PS1, встроенного в мембрану [237]. Пресенилины подвергаются автоэндопротеолизу, что приводит к высвобождению N- и C-концевых фрагментов. Только полноразмерные пресенилины образуют поры утечки Ca^{2+} из ЭПР [259]. Как и многие другие посттрансляционные модификации, предполагается, что автоэндопротеолиз необходим для перехода PS1 из неактивного в активное состояние [237]. Авторы данной работы подтвердили ранее опубликованный воротный механизм для PS1 [138]. В соответствии с опубликованными данными, они обнаружили, что экзон 9 играет роль «пробки», которая закрывает или открывает «отверстие» в каталитический карман PS1 в зависимости от состояния активации. Полученные

результаты свидетельствуют о том, что удаление экзона 9 открывает внутреннее отверстие PS1, что согласуется с фенотипом супертекучих пор мутанта PSEN1 Δ E9 [259].

В заключении, показано что мутации в пресенилинах усиливают высвобождение кальция через два ЭПР-резидентных канала - RyanR и InsP3R. Кроме того, сами пресенилины играют роль каналов утечки Ca²⁺ из ЭПР. Чрезмерное высвобождение Ca²⁺ из ЭПР способствует развитию патологии БА. Модулирование высвобождения Ca²⁺ из ЭПР является многообещающей терапевтической стратегией для снижения токсично повышенного уровня цитозольного кальция.

1.3 Потеря числа грибовидных дендритных шипиков в трансляционных моделях БА - фенотипическое проявление БА

Болезнь Альцгеймера - это болезнь потерянных воспоминаний. Исследования в области изучения механизмов обучения и памяти предполагают, что постоянное увеличение силы синаптической передачи необходимо для достижения долгосрочной модификации свойств нейронной сети и хранения воспоминаний.

В гиппокампе большинство возбуждающих постсинаптических терминалей находится в дендритных шипиках, небольших (d головки < 1 мкм) грибовидных структурах, исходящих из дендритов. Многие шипики связаны с дендритом через узкую шейку, которая действует как диффузионный барьер для компарментализации передачи сигналов в шипиках [245]. Объем шипика тесно связан с функцией: более крупные шипики имеют более широкую постсинаптическую плотность, больше функциональных AMPAR и, вероятно, вызывают больший возбуждающий постсинаптический потенциал [108]. Структура шипиков динамически регулируется в зависимости от активности [129]. ДВП и долговременная депрессия (ДВД) связаны с долгосрочным увеличением [170] и сокращением [294] объема головки дендритных шипиков соответственно. Кроме того, было обнаружено, что сопротивление шейки шипика регулируется в зависимости от синаптической активности [32]. В дополнение к модификации существующих шипиков, формирование нового шипика связано с некоторыми формами ДВП [77]. Эти разнообразные формы структурной пластичности важны для регуляции функции шипика и синаптической пластичности.

Ранее было предположено, что грибовидные шипики образующиеся между возбужденными нейронами являются стабильными «шипиками памяти», которые формируют функционально сильные синапсы и, следовательно, ответственны за хранение памяти [36]. Многие группы исследователей предполагают, что потеря грибовидных шипиков может лежать в основе снижения когнитивных функций мозга во время прогрессирования БА [208, 243, 247].

Экспериментальные доказательства недавно полученные в нескольких клеточных и животных моделях БА поддерживают данную гипотезу. Фракция грибовидных шипиков значительно уменьшилась в культивируемых срезах гиппокампа полученных из трансгенных мышей линии APP_{SDL}, которые экспрессируют человеческий APP695 со шведской (KM595 / 596NL), голландской (E618Q) и лондонской (V642I) мутациями под контролем β -промотора тромбоцитарного фактора роста [246]. Была создана более аккуратная модель амилоидной токсичности. В этой модели человеческий трансгенный APP с голландской мутацией (E693Q) был экспрессирован под контролем нейронального промотора Thy1 (мышь линии DU) [90]. В отличие от большинства трансгенных линий мышей, мыши DU генерируют растворимые олигомеры A β без образования амилоидных бляшек [90]. Такой фенотип имитирует фенотип пациентов с арктическими мутациями (E693G и E693 Δ), у которых развивается БА в отсутствие накопления фибриллярного амилоида [226, 257]. Анатомический анализ шипиков в области CA1 гиппокампа DU мышей показал значительное снижение постсинаптической плотности (PSD) в синапсах образуемых грибовидными шипиками в возрасте 12 месяцев [208]. Авторы работы Прице и др. не сообщили о снижении процента грибовидных шипиков при анализе DU мышей [208], в их работе была тенденция к снижению плотности грибовидных шипиков (Рисунок 3 в работе [208]). Интересно, что потеря грибовидных шипиков обнаруживается не только в модели амилоидной токсичности. В мышах линии PS1-M146V-KI также наблюдали достоверную потерю грибовидных шипиков в гиппокампальных нейронах [243]. Таким образом, потеря грибовидных шипиков, является общей чертой моделей БА.

Существует корреляция между изменениями дендритных шипиков в области CA1 гиппокампа и нарушениями памяти у разных мышинных моделей БА. Потеря грибовидных шипиков в CA1 области гиппокампа в PS1-M146V-KI нейронах [243] может лежать в основе нарушенной поздней фазы ДВП и возрастных изменений в гиппокамп-ассоциированной пространственной памяти у этих мышей [16]. Двенадцати месячные мыши DU демонстрируют уменьшенную длину PSD и тенденцию к снижению плотности грибовидных шипиков в области CA1, а также снижение производительности в водном лабиринте Морриса, что указывает на то, что у этих мышей наблюдается нарушенное гиппокамп-ассоциированное пространственное обучение и память [208]. Также было показано, что A β -опосредованное нарушение памяти у крыс связано с более низкой плотностью синапсов и нарушенной синаптической структурой в зубчатой извилине и в поле CA1 [35].

1.4 Кальций зависимые сигнальные пути регулирующие устойчивость грибовидных шипиков

Синаптическая пластичность в гиппокампе является уникальной клеточной моделью обучения и памяти [68]. Информация проходит однонаправленно через гиппокамп, входя через зубчатую извилину (DG), прежде чем достичь CA3 и, наконец, CA1 (этот последний синапс называется коллатералом Шаффера). В срезах специфические паттерны стимуляции коллатералей Шаффера могут вызывать длительное увеличение и уменьшение синаптической силы, называемые долговременной потенциацией и депрессией соответственно.

Клеточная сигнализация, лежащая в основе ДВП в коллатеральных синапсах Шаффера, была тщательно изучена, и было идентифицировано множество сигнальных молекул [131]. Передача сигналов для большинства форм ДВП начинается с входа ионов Ca^{2+} в постсинаптические дендритные шипки через NMDAR [31]. При покоящемся мембранном потенциале NMDAR блокируются ионами Mg^{2+} в поре канала, но в результате постсинаптической деполяризации Mg^{2+} высвобождается и канал открывается. Таким образом, NMDAR действуют как детектор совпадений для пресинаптического выделения нейротрансмиттера и постсинаптической деполяризации [31]. Повышение Ca^{2+} в шипиках активирует многочисленные сигнальные белки, включая протеинкиназу C (PKC), Ca^{2+} /кальмодулинзависимую киназу II (CaMKII) и небольшие GTPase белки, такие как Ras и Rho [131]. Эти молекулы приводят к клеточным процессам, важным для ДВП и ДВД, таким как полимеризация и деполимеризация актина, мембранный трафик и экзоцитоз и эндоцитоз глутаматных рецепторов [132]. Конечным результатом этих процессов является увеличение синаптической силы, которое для ДВП в коллатералах Шаффера достигается путем введения AMPAR в синапс [68]. Также сообщалось, что может происходить ретроградная передача сигналов от постсинапса к пресинапсу, что увеличивает вероятность выхода пресинаптического нейротрансмиттера [164].

Какие внутриклеточные сигнальные пути могут быть ответственными за потерю грибовидных шипиков при БА? Ранее было предположено, что устойчивость грибовидных шипиков зависит от баланса между активностью синаптической CaMKII и кальцинейрином [29] (Рисунок 4). Таскенберг и др. (2009) считает, что ингибирование NMDAR защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности в органотипических срезах APP_{SDL} [246]. Авторы данной работы утверждают, что активация постсинаптического кальцинейрина вслед за возбуждением NMDAR вызывает гибель грибовидных шипиков в срезах мозга APP_{SDL} мышей [246]. Прице и др. (2014) не исследовали внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за сокращение

площади PSD в грибовидных шипиках в мышинной модели DU [208]. Также ранее сообщалось о потере синаптической локализации CaMKII в кортикальных нейронах в трансгенной линии мышей APP (APP со шведской мутацией, KM670/671NL) или в кортикальных культурах подвергшихся воздействию пептидов A β [101]. Аналогичное снижение в уровне экспрессии pCaMKII было обнаружено в исследовании на гиппокампальных нейронах из мышинной модели PS1-M146V-KI [243]. Кроме того снижения уровня pCaMKII было обнаружено в гиппокампе стареющих мышей [243]. Таким образом, снижение синаптической активности CaMKII является общей чертой мышей моделей БА и, вероятно, актуальны для механизмов нарушения памяти, вызванных старением. Важно отметить, что нарушенное фосфорилирование синаптической CaMKII обнаруживается на стадии лёгкого когнитивного нарушения (от англ. MCI – mild cognitive impairment) у пациентов с БА [211], свидетельствуя о том, что сниженная активность синаптической CaMKII действительно может способствовать развитию данного заболевания у человека. Соответственно фармакологические модуляторы воздействующие на кальций-зависимые сигнальные пути приводящие к активации синаптической CaMKII могут стабилизировать синаптические контакты, тем самым замедлить прогрессирование заболевания.

Отличительной чертой патогенеза БА является медленно прогрессирующая потеря памяти, сначала краткосрочной и позднее долгосрочной. Считается, что на клеточном уровне память хранится в устойчивых синапсах. По мнению многих исследователей БА является в первую очередь болезнью синаптической дисфункции [227] т.к. синаптическая утрата отличает пациентов с деменцией и коррелирует с тяжестью деменции [63, 225, 251]. Рассматривая потерю синапсов как ключевой элемент патогенеза, можно понять, что восстановление или ограничение патологического процесса должно являться основной стратегией фармакотерапии БА.

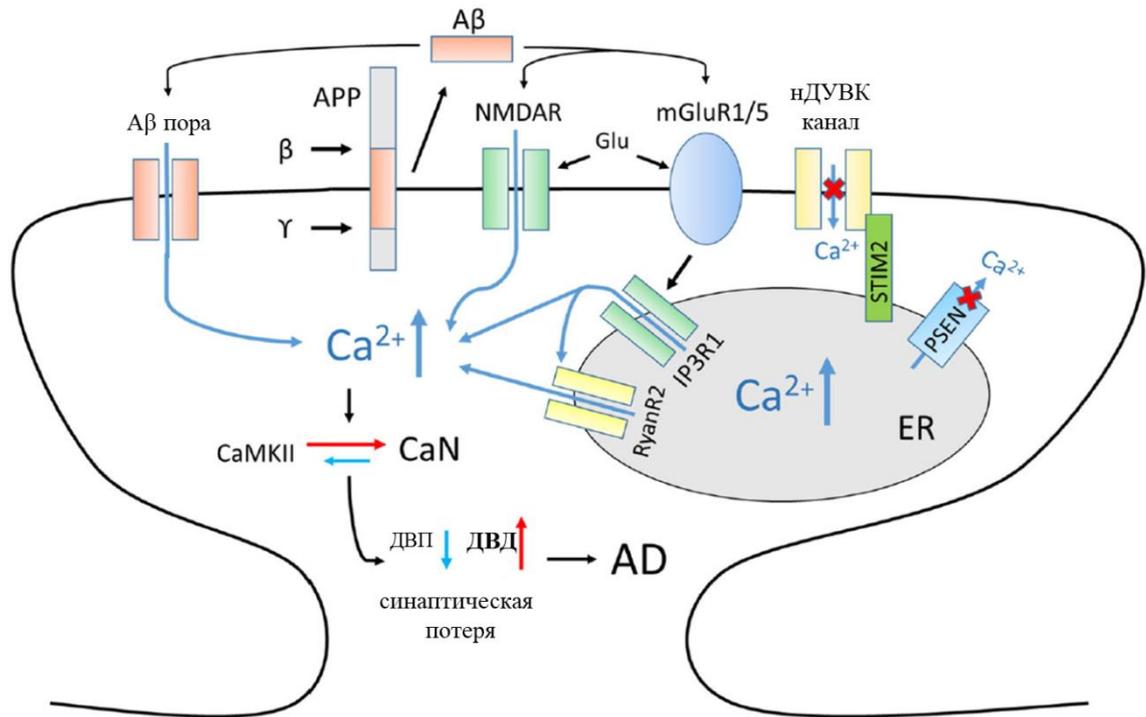


Рисунок 4 Кальций зависимый клеточный механизм синаптической потери в условиях амилоидной токсичности. Пептид бета амилоида (Aβ) получается путем последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP) β-секретазой (β) и γ-секретазой (γ). Aβ способен образовывать Ca²⁺-проницаемую пору в клеточной мембране. Aβ влияет на активность синаптических NMDAR и mGluR5. Глутамат стимулирует активацию рецепторов mGluR1/5, продукцию InsP3 и InsP3R1-опосредованное высвобождение Ca²⁺ из ЭПР (ER). Пресенилины (PSEN) выступают в качестве каналов утечки ионов Ca²⁺. Многие семейные мутации БА нарушают эту функцию пресенилинов, что приводит к перегрузке ЭПР ионами Ca²⁺ и последующему снижению регуляции поступления кальция в нейрональные клетки через нДУВК каналы, контролируемые STIM2. Повышенные уровни Ca²⁺ в ЭПР приводят к усилению высвобождения Ca²⁺ через InsP3R1 и RyanR2. Дисрегуляция Ca²⁺ сигналов в дендритном шипике приводит к снижению активности CaMKII и повышению активности CaN, последующему облегчению ДВД и ингибированию ДВП и потере синапсов. Сокращения, используемые на рисунке: БА - болезнь Альцгеймера, NMDAR - N-метил-D-аспарататный рецептор, mGluR1/5 - метаботропный глутаматный рецептор типа 1 или 5, InsP3 - инозитол трифосфат, InsP3R1 - инозитол трифосфатный рецептор первого типа, ЭПР - эндоплазматический ретикулум, RyanR2 - рианодинорный рецептор второго типа, CaMKII - Ca²⁺/ кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, CaN - кальцинейрин, ДВД - долговременная депрессия, ДВП - долговременная потенция, Glu - глутамат.

1.5 Создание трансляционных генетических моделей болезни Альцгеймера как способ изучения патогенеза заболевания и механизма действия фармакологических агентов

Большинство случаев наследственной формы БА с ранним началом вызываются миссенс-мутациями в генах *PSEN1*, *PSEN2* и *APP* [165, 182, 216, 217]. Для возникновения спорадической формы БА основным фактором риска является преклонный возраст и наличие аполипротеина ε4 [119]. Механизмы нейродегенерации у сБА и нБА схожи, в частности у пациентов с сБА также наблюдается потеря синапсов в гиппокампе и коре, наличие амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков [75, 163]. Потому имитация генетической формы БА с помощью гиперэкспрессии мутантных белков *PSEN1*, *PSEN2* и *APP* в клеточных и животных моделях дает возможность создания трансляционной модели БА имитирующей нарушение фенотипа, в частности изменение морфологии шипиков. На основе соответствия механизмов нейродегенерации генетической формы БА спорадической БА и на основании присутствия нарушения стабильности синапсов у пациентов и в генетических моделях БА возможна попытка экстраполяции генетической модели на спорадические формы БА. Таким образом, эффективная терапия генетической формы БА апробированная на *in vitro* и *in vivo* моделях БА может быть успешно применена для лечения спорадической БА [74].

Важно установить взаимосвязь между изменением уровня кальция в цитозоле/ЭПР, активностью депо-управляемых каналов с фенотипическим проявлением БА в клеточных и животных моделях. По мнению многих исследователей БА является в первую очередь болезнью синаптической дисфункции [227]. Классический синапс образован аксоном передающим информацию и постсинаптическим дендритным шипиком. Считается, что на клеточном уровне память (информация) хранится в зрелых стабильных грибовидных шипиках [36]. Предполагается, что восстановление или ограничение патологического процесса утраты грибовидных шипиков способно замедлить темпы развития БА. Таким образом, фенотипический анализ изменений уровня внутринейронального кальция в нейронах при БА может выражаться в изменении морфологии дендритных шипиков.

Существует мнение, что применение фармакологических препаратов восстанавливающих кальциевый гомеостаз наиболее эффективно на ранних стадиях заболевания [243], потому крайне важно при исследовании эффективности соединений использовать адекватную модель, имитирующую начальную стадию БА. Такой моделью может быть модель амилоидной токсичности, либо модель экспрессирующая мутантный пресенилин, в которой наблюдаются

кальциевый дисгомеостаз и нарушение морфологии дендритных шипиков, которые могут быть восстановлены путем воздействия на нейроны фармакологическими агентами.

1.6 Существующая и разрабатываемая фармакотерапия болезни Альцгеймера на основе модуляторов NMDAR и VGCC

Основным токсическим агентом при БА первоначально был признан β амилоид [228]. В доклинических исследованиях была доказана эффективность амилоид-специфичных антител. Однако в клинике (Eli Lilly & Co.) лекарственные препараты на основе моноклональных IgG1 антител к растворимым формам бета-амилоида (Solanezumab) не улучшали когнитивные функции пациентов с БА [56, 116]. Вероятно, что не исключая важную роль бета-амилоида в патогенезе БА, следует изыскивать другие факторы, возможно предшествующие развитию амилоидной токсичности.

Кальций как вторичный посредник включен в реорганизацию актинового цитоскелета, стабилизируя морфологию постсинаптических контактов путем взаимодействия с кальмомодулин зависимыми киназами (такими как CaMKII и др). Разнообразные кальциевые каналы локализованы на плазматической мембране нейронов, например, NMDAR, потенциал-зависимые каналы, каналы с транзиторными рецепторными потенциалами и др., выполняют важные физиологические функции нейронов. Так, физиологичный вход кальция через каналы NMDAR необходим для поддержания долговременной потенциации и усиления синаптической передачи. Однако при описании патогенеза БА была обнаружена гиперактивация NMDAR как следствие глутаматной эксайтотоксичности [54, 260]. Потому считалось, что необходимо разрабатывать блокаторы кальциевых каналов. Мемантин – блокатор NMDAR – блокирует экстрасинаптические NMDAR, имеет ограниченный терапевтический эффект, не влияет на стабильность синаптических контактов [249]. Важно отметить активация экстрасинаптических NMDAR запускает внутриклеточный сигнальный каскад вызывающий апоптоз нейронов, в то время как стимуляция синаптических NMDAR вызывает главным образом активацию Ca^{2+} -зависимых сигнальных механизмов в ядре клетки и способствует созданию нейропротекторного «щита» путем активации BDNF [103]. Таким образом, мемантин защищает от апоптоза, но не способствует сохранению синаптических контактов.

Большинство фармакологических агентов, воздействующих на NMDAR и исследованных в клинических испытаниях не селективны, не различают субъединицы NMDAR [281]. Блокаторы NMDAR широкого спектра действия такие как, дизоцилпин (МК-801), часто вызывают серьезные побочные эффекты, включая психоз, ухудшение памяти и гибель нервных клеток. Большинство

прошлых попыток по созданию фармакологических препаратов воздействующих на NMDAR предпринимались с целью лечения таких заболеваний как инсульт, черепно-мозговая травма и депрессия [8, 42, 181]. В недавних исследованиях кетамин, схожий с мемантином по механизму действия неконкурентный антагонист NMDAR, показал обещающие результаты в лечении терапевтически резистентной депрессии с ранней манифестацией симптомов [24, 76, 183]. Однако связь антидепрессантного эффекта кетамина с его способностью блокировать NMDAR оспаривается [284]. Недавно были опубликованы данные пилотного клинического исследования фармакологического препарата рапастинеля (GLYX-13) в качестве дополнительной терапии для лечения клинической депрессии у пациентов которые не отвечают на лечение биогенными аминными антидепрессантами [207]. GLYX-13 представляет собой амидированный тетрапептид. Исследования показали, что GLYX-13 может специфически связываться с глициновым сайтом NMDAR и действует как частичный агонист GluN2B-содержащих NMDAR [178, 239]. В отличие от кетамина, GLYX-13 не вызывает психотомиметические побочные эффекты. Последние данные показали, что посредством модуляции NMDAR GLYX-13 приводит к увеличению процента зрелых грибовидных дендритных шипиков и снижению порога для индукции долговременной потенциации [39, 177]. Существуют экспериментальные данные, что мРНК уровни экспрессии субъединиц NMDAR, в частности GluN2B снижаются в мозге пациентов с БА и в моделях БА, указывая на гипофункцию NMDAR в патогенезе БА [175]. Таким образом, GLYX-13 может рассматриваться в качестве потенциального фармакологического препарата для лечения БА.

Существуют данные клинических исследований о применении блокаторов потенциал зависимых кальциевых каналов L-типа в качестве потенциальных препаратов предупреждающих развитие деменции [85]. Было обнаружено, что применение нитрендипина на протяжении 5 лет способно снизить число деменций (Альцгеймерский тип, сосудистая и смешанная) на 55% [85]. Однако такой тип лечения может подойти только пациентам с гипертонической болезнью, в частности с систолической артериальной гипертензией. Кроме того остается неясным факт наличия большого временного интервала между возникновением гипертензии и проявлением симптомов деменции. Также существуют данные об участии потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа Cav1.2 в механизмах индукции NMDAR-независимой долговременной потенциации в CA1 области гиппокампа [255, 270]. Таким образом, применение блокаторов потенциал-зависимых кальциевых каналов для лечения болезни Альцгеймера может вызывать побочные эффекты, обусловленные снижением синаптической пластичности [270].

NMDAR/AMPA/VGCC являются мощными кальций пропускающими каналами (для NMDAR проводимость для ионов кальция составляет 40-80 pS), манипуляция их активностью не позволяет осуществлять тонкую настройку Ca^{2+} сигналинга, весьма необходимую для

поддержания физиологических функций нейронов. Такими функциями являются реакция клетки на неправильно упакованные белки в ЭПР путем их деградации (unfolded protein response), изменение энергетического баланса митохондрий посредством взаимодействия ЭПР с митохондриями, а также тонкая кальций зависимая регулировка порога чувствительности апоптоза при хроническом стрессе. Тонкая настройка кальциевого сигналинга первой реагирует на малейшие отклонения в кальциевом дисгомеостазе [185], восстановив данные нарушения на начальных стадиях болезни можно значительно отсрочить проявления симптомов нейродегенеративных заболеваний, в частности БА. Потому поиск рецепторных канальных образований на плазматической мембране нейронов, а также внутриклеточных кальций-проницаемых каналов на ЭПР и митохондриях, осуществляющих тонкую регулировку является актуальным и может привести к обнаружению фармакологически активных препаратов способных отсрочить или облегчить проявление симптомов болезни.

1.7 Рецепторы осуществляют тонкую регулировку нейронального кальциевого сигналинга и могут выступать в качестве потенциальной терапевтической мишени

Манипуляция активностью мощных кальций пропускающих каналов, таких как NMDAR и VGCC, пока не дала эффективных препаратов, возможно потому, что дисрегуляция NMDAR и VGCC наблюдается на более поздних стадиях развития БА, нежели дисрегуляция тонкой регулировки кальциевого гомеостаза. Существует предположение, что если прицельно воздействовать на дисбаланс тонкой регулировки кальциевого сигналинга на ранних стадиях БА, то есть вероятность отсрочить возникновение и развитие симптоматики заболевания [243]. Важнейшую роль в тонкой настройке кальциевого сигналинга играют внутриклеточные депо ЭПР.

Концентрация Ca^{2+} в ЭПР нейронов увеличивается в экспериментальных моделях БА, включая трансгенных мышей. Основными каналами обеспечивающими высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ЭПР являются рианодиновые рецепторы (RyanR) и инозитолтрифосфатные рецепторы (InsP3R). Таким образом, предполагается, что воздействие фармакологическими агентами на каналы RyanR и InsP3R может давать терапевтический эффект в моделях БА. Было показано, что миорелаксант дантролен, блокатор RyanR, оказывает нейропротекторное действие на мышечной модели БА [45, 196, 203]. Однако было также обнаружено, что длительное лечение дантроленом может ухудшить патологию БА [286]. Кроме того дантролен не обладает специфичностью к нейрональному типу RyanR и может привести к побочным эффектам. Появляется все больше доказательств того, что полная блокада RyanR

нежелательна и токсична. Предполагается, что функция RyanR должна быть стабилизирована, но не заблокирована, чтобы защищать нейроны при БА. Возможным стабилизирующим препаратом RyanR является Rycal. Rycals это класс полученных из бензотиазепина стабилизаторов Ca^{2+} - каналов, разработанные ARMGO Pharma Inc. (Tarrytown, NY) для хронической сердечной недостаточности, сердечной аритмии и катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии [146]. Rycals нацелены на взаимодействие между RyanR и изоформами кальстабина (RyanR1-FKBP12 (кальстабин1) в скелетных мышцах и RyanR2-FKBP12.6 в сердечной мышце), последний из которых стабилизирует закрытое состояние RyanR в нормальных физиологических условиях не затрагивая экспрессию других изоформ [151]. Недавнее исследование в мышинной модели БА показало, что использование Rycal S107 может улучшить синаптическую пластичность, нормализовать поведенческие и когнитивные функции и снизить содержание $A\beta$ [148].

Касательно фармакологических агентов, модуляторов активности InsP3R, существуют данные о наличии такой активности у соединений ксестоспонгин С и 2-АРВ [28, 174]. Однако специфичность ксестоспонгина С к трифосфатным рецепторам инозита оспаривается [236], 2-АРВ имеет другие внутриклеточные мишени [73, 97]. Поэтому вопрос о разработке эффективной лекарственной терапии БА на основе ксестоспонгина С и 2-АРВ остается открытым.

1.8 Нарушение нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах при БА

Нейрональный депо-управляемый входа кальция (нДУВК) - это уникальный клеточный механизм, который пополняет запас кальция в ЭПР в ответ на его истощение [209]. нДУВК один из регуляторов тонкой настройки кальциевого сигналинга в нейронах гиппокампа. ДУВК был первоначально описан в невозбудимых клетках, и считалось, что ДУВК не играет роли в физиологии нейронов. Первые сообщения о роли ДУВК в патогенезе БА были опубликованы в 2000 году. Леиссринг и др. (2000) наблюдали, что фибробласты, выделенные из нокиновой модели PS1-M146V, демонстрируют значительные нарушения в депо-управляемом входе Ca^{2+} после стимуляции клеток брадикинином. Авторы предположили, что нарушение ДУВК связано с повышенным уровнем Ca^{2+} в ЭПР фибробластов PS1-M146V [152]. Ёо и др. (2000) показали изменение активности ДУВК в нейронах экспрессирующих мутантный пресенилин [283]. Первоначально были предложены два различных механизма нБА-PS1-опосредованной дисрегуляции ДУВК [113]. Первый механизм связан с прямым ослаблением ДУВК на мембране клетки, второй механизм вызывает изменения в процессинге APP и генерации амилоидных бета-

пептидов [113]. Позже появилось больше экспериментальных доказательств того, что ДУВК нарушается при патогенезе БА [17, 25, 99, 142, 243, 285].

Существует несколько белков вовлеченных в регуляцию активности ДУВК. Первым является белок STIM, который экспрессируется в ЭПР и детектирует изменения концентрации Ca^{2+} в ЭПР. Существует две изоформы белка STIM: STIM1 и STIM2, которые отличаются по чувствительности к концентрации Ca^{2+} в ЭПР. Белки STIM имеют чувствительный к Ca^{2+} EF-hand мотив, который находится внутри ЭПР и детектирует изменения концентрации Ca^{2+} в ЭПР. EF-hand мотив белка STIM2 обладает более низкой аффинностью к ионам Ca^{2+} и потому первым детектирует изменения концентрации кальция в ЭПР [37]. Активированный STIM2 запускает малые и продолжительные депо-управляемые токи, чтобы пополнить слегка истощенные запасы кальция в ЭПР, тем самым исправляя небольшие колебания концентрации Ca^{2+} в ЭПР [296]. Делеция гена STIM2 вызывает сильное снижение концентрации Ca^{2+} в ЭПР [25, 37, 59], в то время как его избыточная экспрессия вызывает умеренное увеличение Ca^{2+} в цитозоли и ЭПР [37, 100]. STIM1 обнаруживает большие падения концентрации Ca^{2+} в ЭПР. Когда белки STIM обнаруживают дефицит Ca^{2+} в ЭПР, они начинают олигомеризоваться и перемещаются в места плотных контактов ЭПР с плазматической мембраной, где они взаимодействуют с ионными каналами плазматической мембраны, чтобы обеспечить вход Ca^{2+} в клетку (Рисунок 5) [19, 110, 117, 159, 162, 202, 235, 240, 278, 289]. Оба белка STIM1 и STIM2 экспрессируются в нейронах гиппокампа [100], и оба этих белка участвуют в контроле нДУВК.

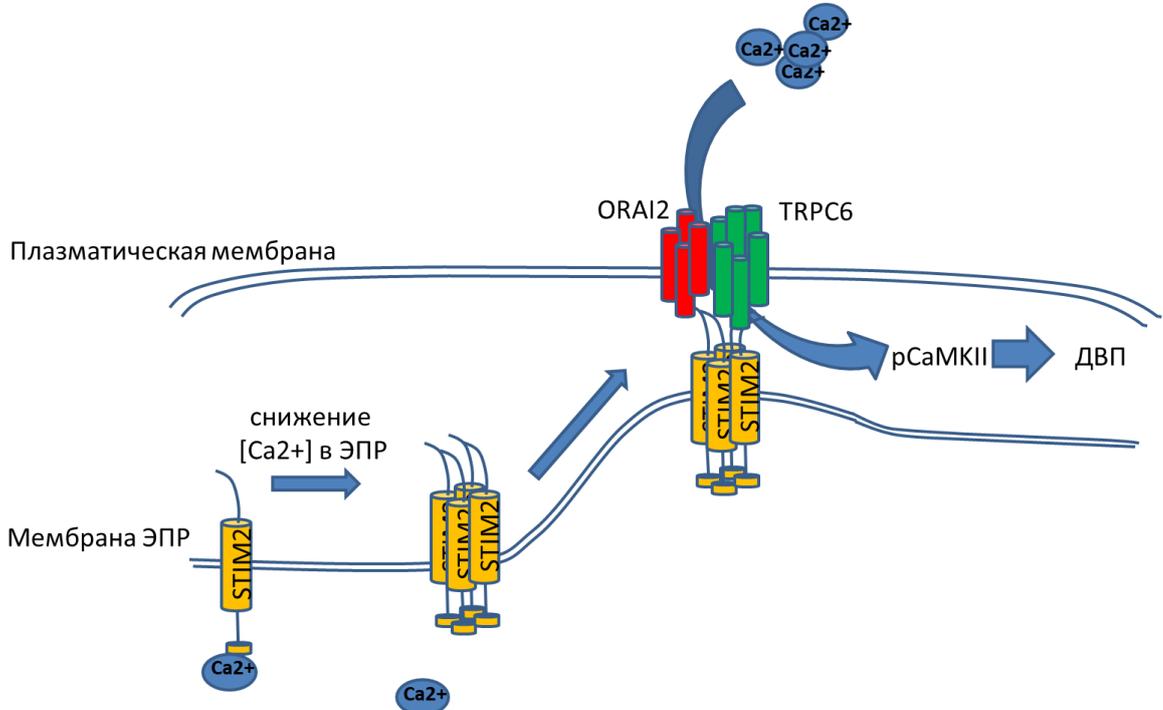


Рисунок 5 Физиологическая регуляция нДУВК в нейронах гиппокампа

нДУВК состоит из двух частей расположенных в разных клеточных компартаментах. ЭПР-резидентный белок STIM2 и белки плазматической мембраны ORAI2 и TRPC6. STIM2 имеет внутриполостной домен в ЭПР, который детектирует изменения концентрации Ca^{2+} в ЭПР. Когда концентрация Ca^{2+} падает в ЭПР, Ca^{2+} диссоциирует от N-концевого чувствительного к кальцию домена в белке STIM2. Это приводит к конформационному изменению STIM2 и способствует его олигомеризации. В олигомеризованном состоянии STIM2 перемещается в места плотных контактов ЭПР с плазматической мембраной, где он связывается с белками-партнерами плазматической мембраны - белками ORAI2 и TRPC6. Это связывание позволяет открывать каналы нДУВК и осуществлять вход Ca^{2+} в нейрон. Предполагается, что вход Ca^{2+} через нДУВК необходим для поддержания уровней pCaMKII и осуществления ДВП.

Другими клеточными игроками, которые регулируют активность ДУВК, являются белки плазматической мембраны из семейства ORAI и семейства TRPC. Показано, что STIM1 ко-локализуется с ORAI1 при истощении запасов Ca^{2+} в дендритах и соме [137]. В другом исследовании высказано предположение, что STIM1 и ORAI1 ко-локализуются и могут взаимодействовать с синаптоподином (SP), белком, который регулирует синаптическую пластичность, в дендритных шипиках гиппокампа [265]. Активация STIM1 и нДУВК была описана в нейронах гиппокампа после активации метаботропных рецепторов глутамата I типа (mGluRI) и мускариновых рецепторов ацетилхолина (mAChR) [190]. С помощью FRET анализа в одиночных органеллах, было показано, что избыточная экспрессия PS1-нБА и PS2-нБА подавляет ДУВК посредством сниженной экспрессии STIM1 [98]. Было показано, что экспрессия и активация конструкции OptoSTIM1 в гиппокампе мыши способны индуцировать нДУВК и способствовать формированию контекстной памяти [147]. Улучшения контекстного обучения были обнаружены у мышей с гиперэкспрессией STIM1 [168]. Гиперэкспрессия STIM1 не влияла на индукцию ДВП в острых срезах гиппокампа, однако блокировала DHPG-зависимую долговременную депрессию [168]. У мышей с условным нокаутом STIM1 наблюдалась умеренная задержка обучения, в то время как у мышей с условным нокаутом STIM2 обучение и память были нормальными. Делеция обоих генов STIM приводила к выраженному ухудшению пространственного обучения и памяти и к увеличению ДВП [92]. Недавние исследования показали, что STIM1 является мишенью для гамма-секретазы. В частности, мутации PSEN1, связанные с нБА, усиливают гамма-секретазное расщепление STIM1, уменьшают активацию ORAI1, подавляют ДУВК и вызывают дестабилизацию дендритных шипиков [258].

STIM2 является преобладающей изоформой гиппокампа [243, 287]. Снижение экспрессии белка STIM2 наблюдалось в клетках пациентов с БА и на мышинных моделях БА [33, 243]. В модели очаговой церебральной ишемии генетическая делеция белка STIM2 нарушает ДУВК и

обеспечивает защиту от неврологического повреждения [25]. Недавно было замечено, что STIM2 перемещается в дендритные шипы и регулирует ORAI1-опосредованный нДУВК [142]. Показано, что STIM2, но не STIM1, влияет на формирование возбуждающих дендритных шипиков и формирует базальную синаптическую передачу в возбуждающих нейронах [91, 282]. Яп и соавторы продемонстрировали нарушение ранней формы ДВП и долговременную депрессию в синапсах гиппокампа CA3-CA1 у взрослых мышей, несущих делецию STIM2 в CaMKII α -положительных нейронах [282]. Показано, что опосредованный вирусом нокдаун экспрессии белка STIM2 вызывает потерю грибовидных шипиков и подавление нДУВК в дендритных шипиках гиппокампа [243]. Более того, было отмечено, что гиперэкспрессия STIM2, а также фармакологическая активация нДУВК в гиппокампе способны защищать грибовидные шипики в различных моделях болезни Альцгеймера [243, 287].

TRPC1 является наиболее тщательно изученным белком из семейства TRPC [51] и участвует в нДУВК, особенно в полосатом теле [275]. Однако его связь с гиппокампальным нДУВК пока неясна. Предполагается, что подавление белков TRPC1 и ORAI1 вызывает снижение ДУВК в астроцитах мышей, нокаутированных по APP [161, 218]. Показано, что TRPC3 вносит свой вклад в регуляцию нДУВК [11, 195]. Однако повышенная экспрессия гена и белка TRPC3 была связана с контекстным дефицитом памяти страха [189]. TRPC6 участвует в регуляции функции сохранения памяти, способствуя формированию возбуждающего синапса через сигнальный путь CaMKIV-CREB [293]. Мыши трансгенные по TRPC6 демонстрируют усиление в формировании дендритных шипиков, пространственного обучения и памяти в водном лабиринте Морриса [293]. TRPC6 обладает активностью не ионных каналов, так как он взаимодействует с APP, что приводит к ингибированию его расщепления гамма-секретазой и снижению продукции A β 42 [268]. Напротив, мутации PSEN2-нБА блокируют вызванную агонистом активацию TRPC6 и, следовательно, вход Ca²⁺ в клетку [154]. Было показано, что TRPC6 взаимодействует с ORAI-1, -2 и -3 [160]. Недавно было показано, что TRPC6 вместе с ORAI2 и STIM2 образуют тройной комплекс, который регулирует нДУВК в культурах гиппокампа [287].

Какова физиологическая роль нДУВК в нейронах гиппокампа? Было показано, что нДУВК участвует в регуляции стабильности зрелых грибовидных шипиков [243, 288]. Грибовидные шипики - это места сильных синапсов, которые необходимы для формирования и хранения воспоминаний (Рисунок 6). Предполагается, что тонкие шипы являются «обучающимися шипиками», поскольку они масштабируются с увеличением и уменьшением синаптической активности [36]. Функция пеньковых шипиков неясна. Существует предположение, что снижение когнитивных функций при БА отражает преимущественную ликвидацию грибовидных шипиков гиппокампа во время прогрессирования заболевания. Было показано, что тонический

депо-управляемый вход кальция необходим для поддержания устойчивости грибовидных шипиков [243]. В соответствии с этим, снижение уровня STIM2 в гиппокампе коррелирует с низкими оценками по краткой шкале оценки психического статуса (MMSE) у пациентов со спорадической болезнью Альцгеймера [243].

Предполагается, что депо-управляемый вход кальция (нДУВК) регулирует стабильность грибовидных шипиков через активность Ca^{2+} -зависимой СаМКII. Активность СаМКII связана с формированием долговременного потенцирования и сильно выражена в синаптических шипиках. Во время синаптической потери снижение фосфорилирования СаМКII, по-видимому, совпадает с повышенной активностью CaN. Действительно, активность CaN-фосфатазы усиливается в стареющих нейронах и играет важную роль в усилении длительной депрессии [87, 125]. Было обнаружено, что депо-управляемый путь поддержания грибовидных шипиков также нарушается в недавно разработанной модели APP-KI мышей БА [288], в стареющих нейронах и в образцах мозга спорадической БА [243]. Интересно, что фармакологическое или генетическое восстановление этого пути у мышей KI восстанавливает процент грибовидных шипиков, а также экспрессию синаптических белков, таких как pСаМКII и белок постсинаптической плотности 95 [243, 288]. Поэтому предполагается, что образование и стабильность грибовидных шипиков регулируется балансом активности СаМКII и CaN. Соответственно, недостаточная активность СаМКII и/или непропорциональная активность CaN приводят к элиминации грибовидного шипика, потере синапса и проявлению когнитивного дефицита. С другой стороны, если активность СаМКII превышает активность CaN, то стабильность грибовидных шипиков сохраняется, а когнитивные функции остаются в норме. Поэтому предполагается, что сигнальный путь нейронального депо-управляемого входа кальция может представлять собой привлекательную молекулярную мишень для разработки методов лечения БА.

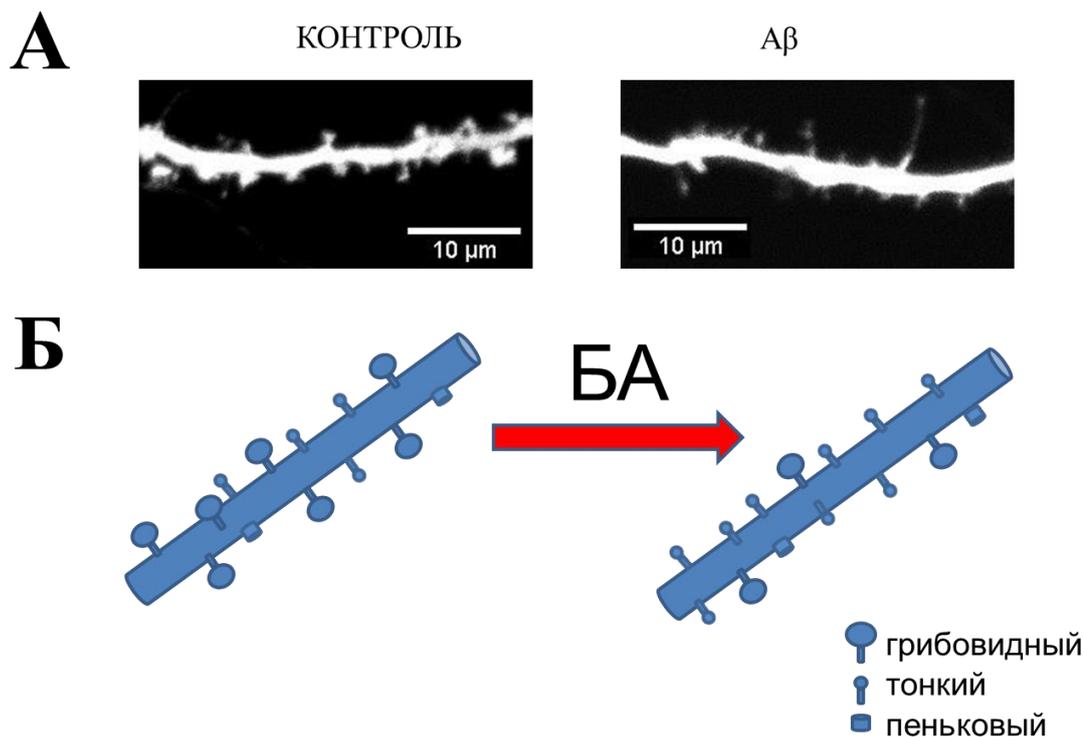


Рисунок 6 Потеря стабильных постсинаптических контактов при БА

(А) Конфокальные микрофотографии фрагментов дендритов с дендритными шипиками в контрольном образце и в присутствии олигомеров Аβ₄₂. Масштабная линейка 10 мкм. (Б) Схематическое представление синаптической потери наблюдаемой в мышинных моделях БА. Постсинаптические контакты делятся на три морфологические группы. У грибовидных шипиков тонкая шейка и большая головка, тонкие шипики имеют тонкую шейку и маленькую едва различимую от шейки головку и пеньковые шипики, которые не имеют шейки. Грибовидные шипики образуют сильные синапсы, которые могут участвовать в формировании и хранении воспоминаний.

1.9 TRPC6 в качестве молекулярной мишени для разработки лекарственной терапии БА

Литературные данные свидетельствуют о том, что каналы TRPC6 могут представлять собой привлекательную молекулярную мишень для разработки терапии, замедляющей БА. Существует также генетическое подтверждение того, что TRPC6 участвует в патогенезе БА. Пониженная экспрессия TRPC6 мРНК наблюдалась у пациентов с БА и умеренными когнитивными нарушениями [167]. Нокдаун экспрессии TRPC6 блокирует нДУВК в гиппокампальных нейронах. Гиперэкспрессия TRPC6-каналов или их фармакологическая

активация восстанавливает нДУВК и потерю шипиков в нейронах гиппокампа при БА [287]. Мыши, которые гиперэкспрессируют TRPC6 в мозге, демонстрируют улучшенную когнитивную функцию и усиленное формирование возбуждающих синапсов [293].

TRPC6 может быть активирован рецептор-зависимым путем, посредством стимуляции фосфолипазы C через G-белок связанные рецепторы, с образованием вторичного посредника диацилглицерола (DAG) который связывается с TRPC6 и способствует открытию канала для входа ионов кальция [115], а также может быть активирован через депо-управляемый механизм, когда инозитол 1,4,5-трифосфат (InsP3) или какой-либо другой сигнал высвобождает Ca^{2+} из внутриклеточных депо ЭПР [71].

В литературе описаны различные химические структуры, которые способны активировать каналы TRPC6. Среди них гиперфорин, NSN21778 (Рисунок 7) [287], производные пиперазина [224]. Для этих соединений описаны TRPC6-зависимые эффекты на нейронах. Гиперфорин является активным компонентом экстракта из травы зверобоя, который демонстрирует нейропротекторные эффекты в различных мышинных моделях БА [44, 72, 118]. В двойной трансгенной мышинной модели APP^{swe}/PSEN1 Δ E9, производные гиперфорина - тетрагидрогиперфорины, улучшают память и доза-зависимо предотвращают нарушение синаптической пластичности, вызывая восстановление ДВП [118]. Также сообщалось, что тетрагидрогиперфорин способен усиливать аутофагический клиренс APP [43]. Нейропротекторный механизм гиперфорина может быть связан с повышенным уровнем фосфорилирования CREB [94 6758], активацией сигнальных путей RAS/MEK/ERK, PI3K и SAMKIV [111, 248], сохранением функций митохондрий [297], а также с восстановлением нДУВК [287]. Однако основными недостатками гиперфорина как лекарственного средства против БА являются высокая стоимость химического синтеза [254], а также нестабильность на свету. Более того, гиперфорин обладает токсическим побочным эффектом, вызывающим желудочно-кишечные расстройства [70, 271].

Соединение NSN21778 (NSN) было недавно обнаружено в качестве положительного модулятора нДУВК [287]. Важно отметить, что NSN21778 отличается от гиперфорина по механизму активации TRPC6. Было показано, что гиперфорин является прямым активатором TRPC6, в то время как NSN облегчает OAG-индуцированный вход Ca^{2+} через каналы TRPC6 в условиях частично истощенных внутриклеточных депо ЭПР [287]. В след за активацией каналов TRPC6, Ca^{2+} проникает в шипики и активирует CaMKII. Все эти события приводят к сохранению и защите дендритных шипиков и памяти от БА [287] (Рисунок 7). Однако NSN демонстрирует неудовлетворительную фармакокинетику и биодоступность, что определяет необходимость поиска других регуляторов TRPC6.

Авторы работы Савамура и др. 2016 показали, что PPZ1 ([4-(5-хлор-2-метилфенил)пиперазин-1-ил] (3-фторфенил) метанон) и PPZ2 активирует каналы TRPC6 диацилглицерол-зависимым путем, но нейропротекторный эффект их соединений осуществляется путем активации сигнального пути BDNF [224]. Кроме того, соединения PPZ1 и PPZ2 обладают кросспецифичностью к TRPC3 и TRPC7, что затрудняет их применимость в качестве лекарственного средства.

Таким образом, механизмы участвующие в кальциевой дисрегуляции известны. На основании известных кальций-зависимых путей предложены потенциальные фармакологические препараты такие как: кетамин, GLYX-13 (NMDAR антагонисты); нитрендипин (антагонист VGCC L-типа); дантролен (RyanR антагонист) и ксестоспонгин С, 2-APB (InsP3R антагонисты); NSN21778, гиперфорин и производные пиперазинов (агонисты депо-управляемого входа кальция), но фармакология данных препаратов остается неудовлетворительной потому существует необходимость поиска новых молекулярных мишеней и новых фармакологических структур прицельно воздействующих на эти мишени.

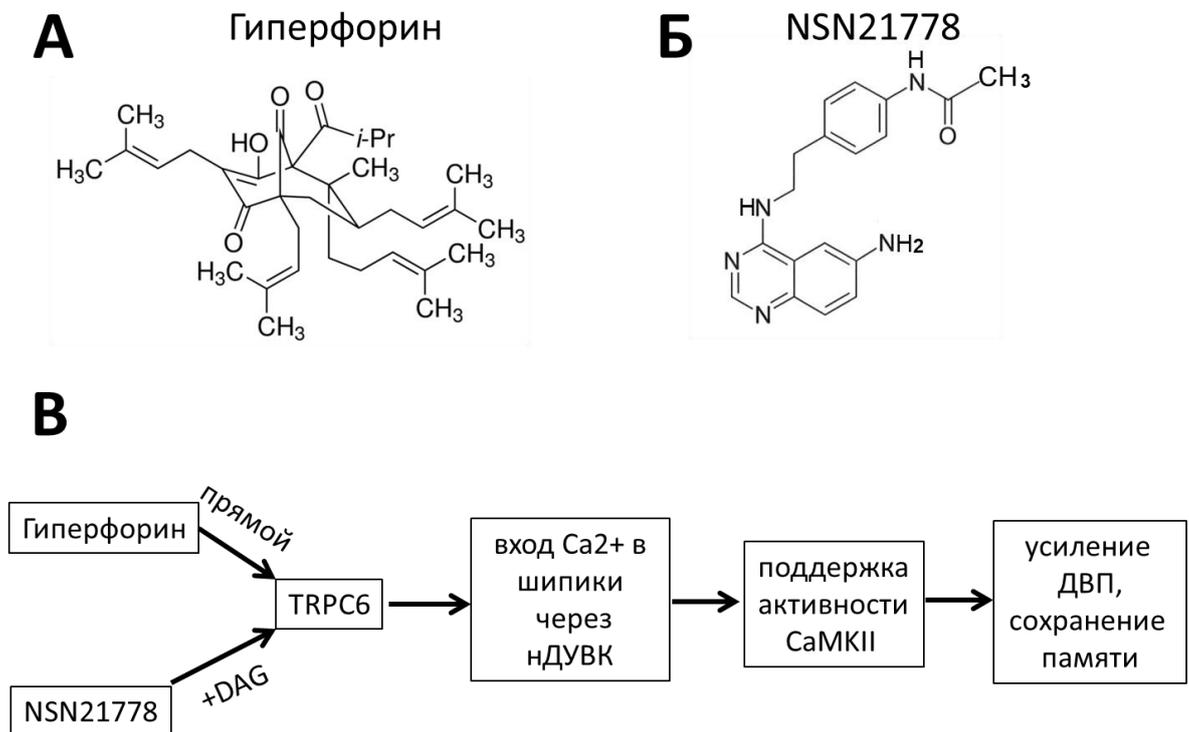


Рисунок 7 Химическая структура гиперфорина и NSN21778, а также механизм их действия в нейронах гиппокампа

(А, Б) Структура гиперфорина и NSN21778. Структура гиперфорина взята с сайта Sigma Aldrich. Структура NSN21778 заимствована из [287]. (В) Схема, демонстрирующая нейропротекторные механизмы гиперфорина и NSN21778. Оба эти соединения активируют

каналы TRPC6. Однако гиперфорин является прямым активатором TRPC6, тогда как NSN21778 модулирует DAG-зависимую активацию каналов TRPC6 в условиях опустошения кальциевых депо ЭПР. Благодаря активации каналов TRPC6 Ca^{2+} входит в дендритные шипики и поддерживает функциональность СаМКП, которая необходима для производительности ДВП и сохранения памяти.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования в рамках диссертационной работы выполнены на базе лаборатории молекулярной нейродегенерации (зав. лаб. – И.Б. Безпрозванный) ФГАОУ ВО «СПбПУ» (ректор университета – А.И. Рудской), располагающей всем необходимым оборудованием для выполнения работы.

Степень достоверности полученных результатов. Все научные положения и выводы обоснованы благодаря системному анализу проблемы; использованию современных методов фармакологии и молекулярной биологии, а также нейробиологии и электрофизиологии; должной выборке экспериментальных образцов (культуры клеток, срезы мозга, животные) в соответствии с обозначенными задачам; достаточному количеству полученных экспериментальных данных; применению соответствующих методов статистического анализа.

2.1 Химические соединения и плазмиды

Соединения аналоги агонистов каналов TRPC6 (на основании структурного подобия известным в литературе агонистам TRPC6): N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (каталожный номер: 51164); N-(4-фторфенил)-2-(4-(о-толил)пиперазин-1-ил)ацетамид (каталожный номер: 50741); 1,1'-(4,6-дигидрокси-1,3-фенилен)бис(пропан-1-он) (каталожный номер: 64402), 46766 (N-(2-хлорфенил)-2-(4-4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)ацетамид) (каталожный номер: 46766) были получены из общедоступной химической библиотеки InterBioScreen (Черноголовка, Россия). Агонист каналов TRPC6 [155] 1,1'-(2,4,6-тригидрокси-1,3-фенилен)бис-1-гексанон (аббревиатура: Нур9) получали из Sigma Aldrich (каталожный номер: H9791). Антагонист депо-управляемых кальциевых каналов TRPC1 [274] типа 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиназолин-4,6-диамин) (аббревиатура: EVP4593) получали из Sigma Aldrich (каталожный номер: SML0579).

Плазмиды lenti-TRPC6, lenti-TRPC6-shRNAi, lenti-Ctrl-shRNAi, pcDNA3.1-PSEN1-дикого типа (WT), pcDNA3.1-PSEN1ΔE9 и GCaMP5.3 были любезно предоставлены Университетом Штата Техас. Плазмида pCSCMA-TD-tomato была приобретена у Addgene (каталожный номер: 30530).

2.2 Вирусы

В работе использовали аденоассоциированные вирусы второго типа (AAV2/1). AAV2/1CMVSTIM2WThrGFP – аденоассоциированный вирус второго типа, несущий мышинный ген STIM2, конъюгированный с флуоресцентным белком GFP, с титром, содержащим 10^{13} вирусных частиц на миллилитр. AAV2 является строго специфичным к нейронам. При инъекции он вызывает гиперэкспрессию белка STIM2. AAV2/1CMVNLS-GFP – аденоассоциированный вирус второго типа, несущий ген GFP, с титром 10^{13} вирусных частиц на миллилитр. NLS (Nuclear Localization Signal) означает, что белок GFP экспрессируется в ядре нейрона. Вирусы были наработаны в комплексе Gene Transfer Vector Core Университета штата Айовы (г. Эймс, США), в бакуловирусной экспрессирующей системе.

2.3 Приготовление олигомерных форм A β 40 и A β 42

Пептиды A β 42 (каталожный номер: 20276) и A β 40 (каталожный номер: 24236) были получены из компании AnaSpec (Фримонт, США). Лиофилизированные аликвоты (1 мг) пептидов A β 42 и A β 40 растворяли в 80 мкл 1% NH₄OH и затем в 920 мкл стерильного фосфатно-буферного раствора (PBS) для получения исходного раствора пептидов с концентрацией 1 мг/мл (хранился в аликвотах по 100 мкл при -20°C). Рабочие растворы A β готовились непосредственно перед обработкой клеток путем разбавления исходной концентрации до конечной концентрации пептида A β в 0,1 мкМ в питательной среде Neurobasal-A (Gibco, Life technologies, США). Согласно протоколу описанному ранее [291] рабочие растворы пептидов инкубировали при +4°C в течение 24 ч для получения олигомерных форм A β . В день использования рабочие растворы A β центрифугировались при 14000 g, + 4°C, 10 минут для очистки олигомерной фракции A β от фибрилл. Олигомерный состав надосадочной жидкости подтверждали с помощью атомно-силовой микроскопии (Рисунок 10) и денатурирующего (0,1% SDS) 15% гель-электрофореза с последующим вестерн-блоттингом с использованием амилоид-специфичных моноклональных антител 6E10 (Covance, SIG-39320) (Рисунок 10). Вестерн-блот повторяли три раза. Количество амилоида бета, нанесенного на гелевую дорожку, составляло 1,2 нмоль для A β 42 и A β 40 и 12 нмоль для A β 42-555. Фракции надосадочной жидкости, содержащие олигомеры A β , использовали для создания условий амилоидной токсичности в гиппокампальных культурах и в гиппокампе взрослых мышей. В экспериментах со стереотаксическими инъекциями использовали пептиды A β 42, конъюгированные с флуорофором Alexa-555 (60480-01, AnaSpec).

Рабочие концентрации пептидов A β 42-Alexa555 для экспериментов *in vitro* составляли 1 мкМ. Другие этапы приготовления рабочих растворов A β 42-Alexa555 были такими же, как описано выше для экспериментов *in vitro*.

2.4 Атомно-силовая микроскопия олигомерных форм A β 40, A β 42, A β 42-Alexa-555

Изображения были получены на атомно-силовом микроскопе SPM Solver P47-Pro с кантилевером NSG 11 (Nt-MDT Co., Зеленоград, Москва, Россия) в воздушных условиях в полуконтактном режиме на подложке из высокоупорядоченного пиролитического углерода. Поверхность углерода бережно промывали деионизированной водой и сушили под струей азота. Программное обеспечение NovaRC1 версии 850 использовали для записи изображений. Для просмотра и обработки данных использовали программное обеспечение Gwyddion. В ходе работы была измерена высота и ширина 9-10 глобул с двух различных областей графитовой подложки. Ширину глобул измеряли на высоте равной половине максимального значения высоты объекта. Для получения более точного значения ширины глобул производили геометрическую деконволюцию [14] по формуле:

$$h = \sqrt{w/2} / 2Rt, \quad (1)$$

где h -реальная ширина объекта, w - ширина объекта, наблюдаемая при помощи атомно-силовой микроскопии, Rt - радиус кончика кантилевера, с допущением, что анализируемые объекты имеют сферическую форму. В данном эксперименте Rt равнялся 10 нм.

2.5 Биоинформатический анализ биологической активности и побочных эффектов у химических соединений

In silico анализ для пяти потенциальных соединений - агонистов каналов TRPC6 проводили с использованием преобразованной версии программы PASS. PASS – это программное обеспечение для прогнозирования спектров биологической активности химических соединений на основе их структурной формулы. В текущем исследовании использовалась онлайн-версия программы PASS (<http://www.way2drug.com/passonline>). Структурные формулы были представлены в форме MarvinJSfiles. PASS оценивает прогнозируемый спектр активности

соединения как возможное наличие активности (P_a) и возможное отсутствие активности (P_i). Прогнозирование этого спектра основано на анализе соотношений структура–активность (Structure-Activity Relationships, SAR) базового набора, содержащего около миллиона соединений, показывающих более 7000 различных биологических активностей [83]. В базовом наборе PASS к "активным" (по конкретным видам биологической активности) соединениям относят соединения, тестирование которых выполнено в различных (но эквивалентных, по мнению экспертов) условиях эксперимента. Все остальные соединения, которые являются менее активными или их активность неизвестна, считаются «неактивными». В качестве выходной информации пользователь получает список прогнозируемых видов активности с оценками вероятности наличия каждого вида активности P_a и вероятности отсутствия каждого вида активности P_i , которые могут принимать значения в диапазоне от нуля до единицы. Вероятности P_a и P_i являются также оценками вероятностей ошибок первого и второго рода соответственно [83]. Чем больше для конкретного вида активности значение P_a и чем меньше значение P_i , тем выше шанс обнаружить данную активность в ходе эксперимента. Если при анализе спрогнозированного спектра активностей для исследования выбираются те активности, для которых $P_a > 0,9$, то высок риск пропустить примерно 90% действительно активных соединений, но вероятность ложноположительных прогнозов при этом очень мала. Если $P_a > 0,8$ – есть риск пропустить около 80% активных соединений, но и вероятность ложноположительного прогноза будет выше. В конце концов, для $P_a = P_i$ вероятности возникновения ошибок первого и второго рода равны. Этот порог и используется для отсекаемых вероятных видов активности при прогнозе [83]. В первую очередь P_a отражает сходство структуры исследуемой молекулы со структурами наиболее типичных активных соединений в соответствующем подмножестве базового набора. Таким образом, нет прямой корреляции значений P_a с количественными характеристиками активности. Действительно активная молекула, обладающая молекулярной структурой, нетипичной для базового набора, может обладать низким значением P_a , а возможно даже $P_a < P_i$. Другой важный аспект интерпретации результатов прогнозирования связан с новизной анализируемого соединения. Если мы ограничимся только видами активности, предсказанными с наивысшими значениями P_a , то соединения, выбранные таким образом, могут оказаться аналогами известных фармакологических агентов. Например, при $P_a > 0,7$ шансы на поиск экспериментальной активности довольно высоки, но найденные соединения могут быть близки по структуре к известным лекарствам [145]. Если мы выберем в диапазоне от 0,5 до 0,7, шансы на обнаружение активности в эксперименте будут ниже, но соединения будут менее похожими на известные фармацевтические агенты. При $P_i < P_a < 0,5$ вероятность обнаружения экспериментальной активности будет еще ниже, но если прогноз будет подтвержден,

исследуемое соединение может оказаться соединением нового химического класса для данной биологической активности [83].

2.6 Приготовление первичной культуры гиппокампа

Нейроны гиппокампа выделяли из белых беспородных мышат, а также из мышат линии C57BL/6J в возрасте 0–2 дня после их рождения и поддерживали в культуре до 15-16 дня по протоколу описанному ранее [243, 286]. Большие полушария мышат рассекали в стерильном ледяном растворе 1ХНБСС (рН=7,2). Гиппокамп извлекали и диссоциировали в растворе папаина (Worthington 3176) при 37°C в течение 30 мин. Чтобы удалить из раствора большие недиссоциированные клеточные агрегаты нейроны гиппокампа дважды обрабатывали DNaseI (1 мкг/мл) (DN-25, Sigma). Чтобы удалить из суспензии нейронов остатки DNaseI суспензию центрифугировали при 1500 об/мин в течение 4 мин. Получающуюся в результате центрифугирования надосадочную жидкость удаляли и добавляли свежую, теплую (37°C) питательную среду (Neurobasal-A (Gibco, 10888), 1xB27 (17504, Gibco), 1% инактивированную теплом FBS (16000, Gibco), 0,5 мМ L-глутамин (25030, Gibco)). Нейроны высаживали в 24х луночный планшет, содержащий в каждой лунке 12 мм круглое стекло Menzel (d0-1) предварительно покрытое 1% поли-D-лизином (p-7886, Sigma). Плотность нейронов при посадке составляла $\sim 5 \times 10^4$ клеток на лунку (при использовании 24х луночного планшета). Питательную среду для роста нейронов меняли на следующий день после посадки, затем еженедельно. В контрольных экспериментах нейрональные культуры обрабатывались эквивалентным объемом (объем равный объему растворов Аβ, добавляемого в культуру) Neurobasal-A, выдержанного при + 4°C в течение 24 ч.

2.7 Иммуоцитохимия

Первичные культуры нейронов гиппокампа фиксировали раствором для фиксации (4% формальдегид в PBS, рН=7,4) в течение 30 мин при комнатной температуре, трижды промывали PBS с 0,05% Tween-20 затем инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в буфере PBS с 5% BSA. Первичные антитела: мышинные анти-map2 mAb (1:1000, Chemicon, mAB378) и кроличьи анти-Synapsin I (1:1000, Chemicon, Temecula, CA) разбавляли в 2,5% BSA в PBS с 0,025% Tween-20 и выдерживали при комнатной температуре в течение 3 часов. После трех промывок (PBS с 0,05% Tween-20), культуры гиппокампа инкубировали в PBS с 2,5% BSA и

вторичными антителами (1:1000, Alexa Fluor 488 или 594, Invitrogen) в течение 1,5 ч при комнатной температуре и визуализировали на конфокальном микроскопе (Thorlabs, Россия). Для того, чтобы сравнить данные из разных культур средняя интенсивность флуоресценции канала А (Synapsin) нормировалась на среднюю интенсивность флуоресценции канала В (MAP2).

2.8 Кальций фосфатная трансфекция первичных нейронов гиппокампа

Для осуществления кальций фосфатной трансфекции нейронов гиппокампа использовали набор Clontech CalPhos Mammalian Transfection Kit (TAKARA Biotechnology #631312), включая 2М CaCl₂, 2X Hank's balanced salt solution (HBS) и стерильную воду. Трансфекцию проводили на 6,7-дневной культуре гиппокампа по протоколу описанному подробно в [2]. Перед началом процедуры готовили следующие среды: «Среда для трансфекции» (14,58 мл Neurobasal, 37,5 мл 200мМ L-глутамин), «Свежая ростовая среда» (14,58 мл Neurobasal, 150 мкл FBS, 37,5 мл 200мМ L-глутамин, 300 мкл 50xB27), «Среда для закисления» (14,58 мл Neurobasal, 37,5 мл 200мМ L-глутамин). Все среды нагревали до температуры 37°C в CO₂ инкубаторе. «Старую среду» с планшета собирали в отдельную пробирку (15 мл Falcon tube) и хранили при 37°C, в CO₂ инкубаторе. В каждую лунку 24 луночного планшета добавляли по 0,5 мл «Среды для трансфекции» и убирали планшет в инкубатор. Затем готовили растворы А и Б (Таблица 1) для трансфекции.

Таблица 1 Состав раствора А для кальций фосфатной трансфекции

Раствор А	на лунку (24 луночный планшет)
ДНК (1мкг)	1 мкл
2М CaCl ₂	3 мкл
H ₂ O	21 мкл
Σ	25 мкл

Раствор Б: 25 мкл 2xHBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, #1255093) на лунку.

Добавляли по капле раствор А в раствор Б по ¼ от объема за раз, после каждого добавления мешали на настольной мешалке на низкой скорости. Смесь растворов А+Б инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин (можно без инкубации сразу переходить к следующему шагу). После окончания инкубации смесь растворов А + Б добавляли к культуре по 25 мкл на лунку. Культуру инкубировали в присутствии растворов А + Б в течении 1 часа при 37°C в CO₂ инкубаторе. По истечению времени под микроскопом в нейронах наблюдали небольшие точки (Рисунок 8 Б, В), это означало, что комплексы ДНК-Ca²⁺-фосфат образовались и велика вероятность, что ДНК попала в клетку.

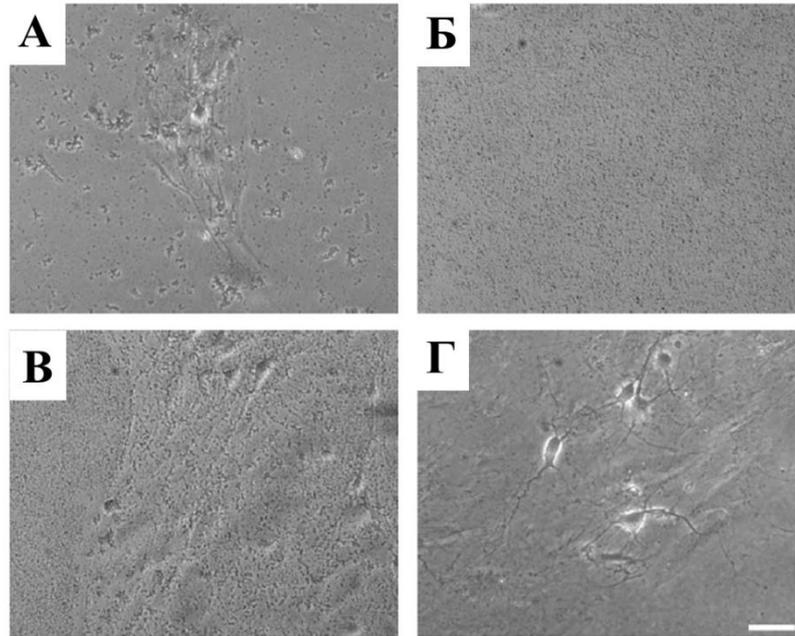


Рисунок 8 Формирование и последующее растворение осадка ДНК- Ca^{2+} -фосфат. (А) Продолжительное и интенсивное перемешивание ДНК с Ca^{2+} и фосфатным буфером вызывает образование осадка крупного размера, который токсичен для нейронов. (Б, В) образование осадка правильного размера, достигается в результате мягкого перемешивания на настольной мешалке. (Г) растворение осадка ДНК- Ca^{2+} -фосфат после инкубирования клеток в «закисленной среде». Масштабная линейка соответствует 50 мкм. Рисунок заимствован из [124].

«Среду для закисления» закисляли при помощи барбитажа из CO_2 баллона до желтого цвета и фильтровали через фильтр с диаметром 0,22 мкм. «Среду для трансфекции» отбирали с поверхности клеток при помощи серологической пипетки и добавляли «среду для закисления» по 0,5 мл на лунку, для разрушения комплексов ДНК- Ca^{2+} -фосфат. Планшет инкубировали в течение 5 мин при 37°C . По истечении времени инкубации закисленную среду отбирали с поверхности клеток, и добавляли по 0,5 мл «свежей ростовой среды» и 0,5 мл «старой среды». Результаты трансфекции визуализировали на 14-16 день культивирования (Рисунок 9).

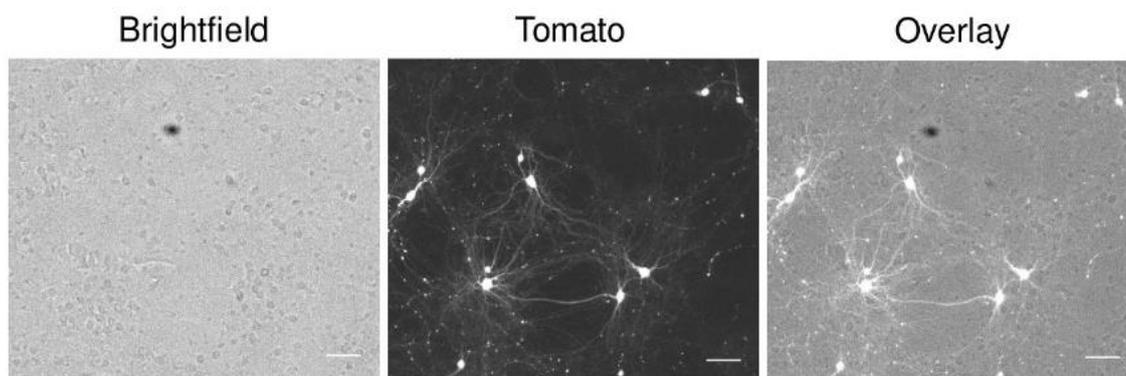


Рисунок 9 Эффективность кальций фосфатной трансфекции. Первичная культура гиппокампа на 16 день культивирования экспрессирующая флуоресцентный белок Tomato (средний рисунок). Рисунок слева демонстрирует светлопольную микроскопию (Brightfield), рисунок справа наложение светлопольной и конфокальной микроскопии (Overlay). 12 из 65 пирамидальных нейронов в поле видимости экспрессируют Tomato. Эффективность трансфекции составляет 18%. Масштабная линейка соответствует 100 мкм.

2.9 Анализ морфологии дендритных шипиков в первичных культурах гиппокампа

Для анализа морфологии шипиков проводили исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из конфокального микроскопа ThorLabs, цифровой камеры, персонального компьютера и программного обеспечения «ThorLabs» (USA). Данные анализировались путем получения серии срезов при 100-кратном увеличении (OlympusUPlanSApo). Максимальное разрешение каждого изображения составляло 1024×1024 пикселя с плотностью разрешения 0,1 мкм / пиксель, каждое изображение сканировали шесть раз и усредняли. Общий объем по Z составлял 6-8 мкм с Z-интервалом в 0,2 мкм.

Для количественного анализа использовалось по меньшей мере 18 трансфицированных нейронов для каждой экспериментальной группы из трех независимых экспериментов. Анализ морфологии дендритных шипиков производили при помощи программы Neuron Studio software package согласно методике, описанной в статье [215], позволяющей автоматически реконструировать трехмерное изображение шипиков и распределять их на три группы (грибовидные, тонкие, пеньковые) по заданным параметрам. Чтобы классифицировать морфологию дендритных шипиков в культуре, мы адаптировали алгоритм из опубликованного метода [215].

Для классификации формы шипиков в культуре нейронов были использованы следующие параметры: отношение размеров головки шипика к шейке ($HNR(crit) = 1,4$), соотношение сторон для тонкого шипика ($AR_thin(crit) = 2,5$), размер головки грибовидного шипика ($HD(crit) = 0,45$ мкм).

2.10 Измерение осцилляций внутриклеточного кальция с использованием красителя Fura-2AM

Мониторинг изменений внутриклеточных концентраций кальция с использованием красителя Fura-2 в форме проникаемого через мембраны ацетоксиметилового эфира (AM) на клетках НЕК293Т проводили, как описано ранее в статье [250]. Клетки НЕК293Т трансфецировали плазмидой, кодирующей экспрессию флуоресцентного белка EGFP, или смесью плазмид, кодирующих экспрессию белков EGFP и TRPC6 (соотношение 1:3). Через 48ч после трансфекции НЕК293Т инкубировались в 5 мкМ растворе Fura2AM (F1201, Molecular Probes) в искусственной спинномозговой жидкости (ACSF: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ (или 100 мкМ EGTA), 10 mM HEPES [pH 7,3]) с добавлением 5 мкМ тапсигаргина (тапсигаргин – Tg, 67526-95-8, Sigma) для блокировки активности насоса SERCA, в течение 45 мин при 37°C. Для визуализирующих экспериментов стекла с НЕК клетками переносили в ванночку для записи кальциевых осцилляций с перфузией жидкости (RC-26G, Warner Instrument), где поддерживали температура 37°C (PH1, Warner Instrument). Ванночку закрепляли на предметном столике на инвертированном микроскопе Olympus IX-70 и перфузировали раствором ACSF+Tg посредством гравитационного потока. После получения стабильного изображения с GFP флуоресценцией стекло с НЕК клетками интенсивно промывали бескальциевым раствором ACSF (вместо CaCl₂ добавляли 100 мкМ EGTA). Чтобы получить изображения входа кальция в клетку, бескальциевую среду меняли на раствор ACSF+Tg с 2мМ Ca²⁺, после чего возбуждали флуоресценцию Fura-2 ультрафиолетовым светом с длиной волны 340 нм и 380 нм (иллюминатор DeltaRAM, PTI) с использованием Fura-2 дихроичного фильтровального куба (Chroma Technologies) и 60×УФ-масляного объектива (Olympus). Испускаемый Fura-2 свет регистрировали камерой IC-300 (PTI), а изображения оцифровывали с помощью программного обеспечения ImageMaster Pro (PTI). Исходные (30 с) измерения – «базовые линии» кальциевых осцилляций – получали до добавления растворов содержащих ионы кальция. Также в эксперименте применяли кальциевые растворы с добавлением 10 мкМ гиперфорина (238074-03-8, Sigma) или 30 мкМ 51164. Чтобы проверить влияние 51164 на OAG-зависимую активацию ДУВК, клетки перемещали на 2 минуты в среду ACSF, содержащую 0,1

мМ Ca^{2+} , а затем возвращали в среду ACSF, содержащую 2 мМ Ca^{2+} и 50 мкМ OAG. Эти эксперименты проводили в присутствии или в отсутствие 30 мкМ 51164. Изображения с длиной волны возбуждения 340 и 380 нм регистрировали каждые 2 с и представляли в виде отношения изображений 340/380 в каждый момент времени. Фоновую флуоресценцию определяли в соответствии с рекомендациями производителя (PTI) и вычитали из регистрируемой флуоресценции. Эксперименты по записи кальциевых осцилляций проводили при комнатной температуре.

2.11 Измерение осцилляций внутриклеточного кальция с использованием красителя Fluo-3AM

На 14 день культивирования нейрональные культуры окрашивали кальций чувствительным красителем Fluo-3AM (Invitrogen) в искусственной спинномозговой жидкости (ACSF), содержащей 2мМ Ca^{2+} . Окрашивание проводили при 37°C в течение 30 мин с последующими двумя этапами промывки свежим ACSF, предварительно нагретым до комнатной температуры, каждый этап промывки занимал 10-15 мин. Возбуждение Fluo-3AM проводили на конфокальном микроскопе (Thorlabs) с диодным лазером на длине волны 488 нм, регистрацию эмиссии Fluo-3AM осуществляли на длине волны в 525 нм. Базовые (f0) осцилляции Ca^{2+} регистрировали в течение 3 минут, затем к нейронам добавляли 50 мкМ глутамата (Glu), а осцилляции Ca^{2+} после добавления глутамата (f) регистрировали в течение 7 минут. В эксперименте изображенном на рисунке 12 перед добавлением глутамата нейроны гиппокампа обработанные A β 40 или A β 42 предварительно инкубировали с блокатором N-метил-D-аспаратного рецептора (NMDAR) - ионами магния (Mg^{2+}) [206, 280] (10 мМ, 30 мин) или оставляли без воздействия.

2.12 Измерение нДУВК в постсинаптических дендритных шипиках с использованием плазмиды GCaMP5.3

Измерение нДУВК в постсинаптических дендритных шипиках проводили на трансфицированных плазмидой GCaMP5.3 нейронах по протоколу описанному ранее [288], с некоторыми изменениями в протоколе. Эксперименты по визуализации GCaMP5.3 проводили с нейрональными культурами гиппокампа на DIV14-16 в ванночке RC-26G для записи кальциевых осцилляций без перфузии.

Флуоресцентные изображения GCaMP5.3 и их количественный анализ, представленные на рисунках 28, 29, 37, 41 были получены с использованием прямого конфокального микроскопа Thorlabs, оснащенного объективом 60×/1,00 Вт LUMPlanFL N (Olympus). Флуоресценция GCaMP5.3 возбуждалась при 488 нм с помощью диодного лазерного источника (Thorlabs, США). Эмиссию GCaMP5.3 фильтровали через фильтр 525 ± 50 нм (Chroma, США) и регистрировали с помощью PMT SS2 (Thorlabs, США). Эксперименты контролировали программным пакетом для получения изображений Thorimage LS 1.4 (Thorlabs, США). Для измерения нДУВК в шипиках нейроны перемещали из культивируемой среды в среду ACSF без кальция. Затем на нейроны воздействовали 5 мкл 2 mM Ca²⁺ через пипетку Eppendorf. В случае, когда изучали эффект соединений 51164 / EVP4593, их добавляли в ванночку в концентрации 300 / 30 нМ, соответственно совместно с блокаторами ионных каналов. В частности, нейроны переносили в среду без кальция: 400 мкМ EGTA, 1 мкМ тапсигаргин, 10 мкМ D-AP5, 50 мкМ нифедипина, 10 мкМ CNQX, 1 мкМ TTX и 30 нМ EVP4593 на 15 мин, затем добавляли 5 мкл 2 mM Ca²⁺.

Флуоресцентные изображения GCaMP5.3 и их количественный анализ, представленные на рисунке Рисунок 40, были получены с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX73, оснащенного объективом 60×/1,00 Вт LUMPlanFL N (Olympus). Эксперименты контролировали с помощью пакета программного обеспечения для получения изображений Micro-Manager 2.0 (Vale Lab, UCSF). Флуоресцентные изображения GCaMP5.3 получали с помощью камеры Zyla 4.2 sCMOS (Andor, США). Флуоресценцию GCaMP5.3 возбуждали светодиодным источником 470 нм (Thorlabs, США), контролируемого DC4104 (Thorlabs, США). Полученные изображения в Micro-Manager 2.0 анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ. Для измерения нДУВК в шипиках нейроны переносили из культивируемой среды в среду ACSF без кальция, содержащую следующие препараты: 400 мкМ EGTA; блокаторы кальциевых каналов: «1 мкМ тапсигаргин, 10 мкМ D-AP5, 50 мкМ нифедипин, 10 мкМ CNQX, 1 мкМ TTX» на 15 мин. Затем среду, свободную от кальция, заменяли на среду с 2 mM Ca²⁺ в присутствии блокаторов кальциевых каналов.

Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения ImageJ. Области интереса, используемые в анализе изображений, соответствовали отдельным шипикам. Все эксперименты по визуализации осцилляций кальция проводились при комнатной температуре.

2.13 Мыши

Белые беспородные мыши альбиносы (полученные из ФГУП Питомник лабораторных животных «Рапполово», деревня Рапполово, Ленинградская область, Россия), а также мыши

линии C57BL/6J (000664, Jaxlab, США) были использованы в качестве источника мозговой ткани для экспериментов с культурами гиппокампа. Мышей линии M Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J (007788, Jaxlab, США) [79] использовали в экспериментах по визуализации морфологии дендритных шипиков в гиппокампе взрослых мышей. Мышей дикого типа (WT) (линия C57BL/6J генотип), получали из лаборатории Jaxlab (000664, США).

Модель линий нБА 5xFAD получали из лаборатории MMRC (34840, США). 5xFAD представляет собой линию трансгенных мышей с пятью мутациями: три в генах человеческого APP-белка (Swedish (K670N/M671L), Florida (I716V), London (V717I)) и две в гене пресенилина 1 (M146L, L286V). Мышей содержали в виварии Лаборатории молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого с 12-часовым световым циклом, со свободным доступом к воде и пище.

2.14 Этика

Все *in vitro* эксперименты с участием мышей были одобрены комитетом по уходу и использованию животных в научно-исследовательском институте Гриппа Минздрава Российской Федерации, по согласованию с Министерством сельского хозяйства Российской Федерации.

Поведенческие эксперименты с животными проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. №199н "Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики" после одобрения биоэтической комиссии СПХФУ.

2.15 Генотипирование мышей

Наличие трансгена в мышечных особях линии 5xFAD и в мышцах линии M проверяли при помощи процедуры генотипирования. Необходимый ДНК-материал выделяли из кончика хвоста животного. Кончик хвоста мыши, растворяли при температуре 55°C от 2 до 16 ч в 125 мкл буфера SNET (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS (pH = 8)), содержащем 10 мкл 10 мг/мл протеиназы К. Далее ДНК-материал экстрагировали фенол-хлороформной экстракцией.

Наличие трансгена проверяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, специфичных для вставки, вызывающей экспрессию трансгенных (человеческих) генов PSEN1 и APP, а также ген GFP в отдельных нейронах мозга. Используются следующие праймеры:

Пара праймеров для определения трансгена GFP в мышцах линии M

5` CGG TGG TGC AGA TGA ACT T 3`

и

5` ACA GAC ACA CAC CCA GGA CA 3`

(фланкирует участок ДНК длиной 415 пар оснований),

пара праймеров для определения трансгена PSEN1

5` AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA 3`

и

5` GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT 3`

(фланкирует участок ДНК длиной 600 нуклеотидных пар оснований),

пара праймеров для определения трансгена APP

5` AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG 3`

и

5` CGG GGG TCT AGT TCT GCA T 3`

(фланкирует участок ДНК длиной 350 нуклеотидных пар оснований),

пара контрольных праймеров

5` CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT 3`

и

5` GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C 3`

(фланкирует участок ДНК длиной 324 нуклеотидных пары оснований).

2.16 **Стереотаксические инъекции вирусов в CA1-область гиппокампа мышей**

Для стереотаксических инъекций использовали мышей в возрасте 2 мес. Экспериментальной группе мышей вводили вирус AAV2-STIM2 в объеме 3 мкл. За точку с координатами (0,0,0) принимали положение брегма на черепе. Инъекции проводили билатерально с использованием следующих координат:

угол 10° в плоскости medial/lateral;

расстояния были +2,0 мм в плоскости anterior/posterior,

+2,6 мм в плоскости medial/lateral,

+1,9 мм в плоскости dorsal/ventral.

Инъекции проводили со скоростью 0,5 мкл/мин. Каждая экспериментальная группа включала три мыши. Обезболивание животных проводили двумя последовательными

внутрибрюшинными инъекциями анестезирующего раствора на основе уретана и ксилазина (4 мл 0,9%-го NaCl, 1 мл препарата Рометар (действующее вещество – ксилазина гидрохлорид), 200 мг уретана (U2500-250G, Sigma)) с интервалом в 10 мин. После операции мышь выводили из наркоза посредством внутрибрюшинного введения 100 мкл раствора препарата Антиседан (0,5 мл препарата (действующее вещество – атипамезол гидрохлорид) в 7 мл 0,9%-го NaCl. Во время операции и реабилитации оптимальную температуру тела мыши поддерживали при помощи термостатируемого коврика (Temperature Controller, RWD Life Science CO., Ltd).

2.17 Анализ морфологии дендритных шипиков в срезах мозга

Спустя 6 недель после стереотаксической инъекции предварительно анестезированным мышам проводили транскардиальную перфузию холодным 1,5 % раствором параформальдегида (ПФА) в фосфатном буфере (pH=7,4) со скоростью 3 мл/мин в течение 10 минут. Мозг извлекали и фиксировали в 1,5 % растворе ПФА в течение 16 часов при температуре +4°C. Срезы мозга толщиной 300 мкм готовили при помощи вибратома (WPI, NVSLM1, США) и хранили в 0,5% растворе ПФА при температуре +4°C. Изображение нейронов получали на двухфотонном микроскопе (Thorlabs, США) с использованием линзы с двадцатикратным увеличением (Olympus). Флуоресценция GFP возбуждалась длиной волны 920 нм. Для 3D реконструкции морфологии дендрита проводили послойное сканирование с интервалом по оси Z в 0,5 мкм и усреднением 12 раз по каждой рамке считывания. Изображения имели разрешение 1024 на 1024 пикселей. Анализ морфологии дендритных шипиков проводили на вторичных апикальных дендритах. В каждой группе из 3 мышей было проанализировано от 21 до 30 нейронов. Для анализа использовали программу NeuronStudio (NIH, США), позволяющую идентифицировать различные типы дендритных шипиков, такие как тонкие, пеньковые и грибовидные. Основные параметры, использованные в программе: соотношение сторон для тонкого шипика = 2,5, отношение размеров головки шипика к шейке = 1,3, диаметр головки грибовидного шипика = 0,2 мкм. Для каждого нейрона рассчитывали процентное содержание шипиков разного типа (количество шипиков данного типа, деленное на общее количество шипов) и плотность (общее количество шипов, деленное на длину нейрона). Полученные данные усредняли по всем нейронам.

2.18 Приготовление лизатов гиппокампа

Мышам в возрасте 4 и 6 мес проводили транскардиальную перфузию холодным фосфатным буфером со скоростью 3 мл/мин в течение 10 мин. Перед этим мышь анестезировали 200 мкл раствора уретана (U2500-250G, Sigma) в физиологическом растворе (0,9% NaCl), в концентрации 300 мг/мл. Гиппокамп извлекали, гомогенизировали и лизировали в буфере со следующим химическим составом, в мМ: NaCl 137, KCl 2,7, Na₂HPO₄ 4,3, KH₂PO₄ 1,4, EDTA 5,0, EGTA 5,0, PMSF 1,0, NaF 50, Na₃VO₄ 1,0 (pH =7,2); 1 % CHAPS, ингибиторы протеаз (1 табл. на 100 мл лизирующего буфера, SIGMAFAST Protease Inhibitor tablets, Sigma, S8820-20TAB) и фосфатаз (200 мкл на 100 мл лизирующего буфера, Phosphatase Inhibitor Cocktail, Sigma, P0044-5ML).

Процесс лизиса гиппокампа проводили в течение 1 ч. Далее лизат центрифугировали 10 мин со скоростью 14000 об/мин. Надосадочную жидкость собирали и хранили при температуре -20°C.

2.19 Вестерн-блот анализ

Белки, содержащиеся в лизатах культур клеток либо в лизатах гиппокампов, разделяли электрофоретическим методом в полиакриламидном геле состава: 0,375 М трис-хлор (pH =8,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 10% акриламид, 0,3% бис-акриламид.

Белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида при подаче напряжения 20 В в течение 16 ч. Далее мембрану блокировали в 5%-м растворе альбумина бычьего сывороточного (BSA) в TBST (50 мМ трис, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20 (pH=7,6) в течение 1 ч. Содержание различных белков в пробах анализировали при помощи антител (перечислены далее).

Первичные антитела: кроличьи anti-STIM1 pAb (1:1000, Cell Signaling, 4916 s), кроличьи anti-STIM2 pAb (1:1000, AnaSpec, 54681), мышинные anti-Phospho-CaMKII (1:2000, Abcam, ab171095), мышинные anti-CaMKII (1:1000, Chemicon, MAB8699), мышинные anti-PSD95 (1:1000, Cell Signaling, 3450s), мышинные anti-actin clone C4 (1:1000, Millipore, MAB1501), мышинные anti-tubulin (1:1000, DSHB, E7-c) и мышинные anti-Beta Amyloid 1-16 (6E10) (1:1000, Covance, SIG-39320-500).

Вторичные антитела: анти-rabbit (антикроличьи) HRP-conjugated (1:2000, DAKO, P0448) и anti-mouse (антимышинные) HRP-conjugated (1:2000, DAKO, P0447).

Мембрану обрабатывали первичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре или 16 ч при температуре +4°C. Обработка мембраны вторичными антителами длилась 1 ч при комнатной температуре. После обработки каждым из соответствующих друг другу первичными и вторичными антителами мембрану отмывали 5 раз по 5 мин в TBST. Для прояски мембрану инкубировали в течение 1 мин в реагенте, вызывающем хемилюменесценцию (8,5 мл воды, 1,5 мл трис (pH= 8,8), 50 мкл люминола (44 мг/мл), 22 мкл кумаровой кислоты (15 мг/мл), 7 мкл 30%-й перекиси водорода). Сигналы хемилюменесценции регистрировали на рентгеновскую пленку (Medical X-Ray screen film blue sensitive, CEA), их изображения сканировали и сохраняли в формате tiff. Анализ полученных данных проводили с использованием программы Quantity One (программное обеспечение компании BioRad). Измеренный объем зоны исследуемого белка в каждом образце (произведение интенсивности сигнала хемилюменесценции на его площадь) делили на объем зоны актина того же образца, и полученное частное усредняли по трем значениям в каждой группе.

2.20 Приготовление тонких срезов головного мозга мыши

Через шесть недель инжектированных AAV-вирусами мышей перфузировали холодным 4%-м раствором ПФА; затем проводили экстракцию головного мозга, который на одну ночь помещали в 4%-й раствор ПФА, а на следующий день эту жидкую среду заменяли 30%-м раствором сахарозы. После этого с каждого мозга были сделаны тонкие (50 мкм) срезы при помощи вибратома (VIBRATOME 1000 Microtome, IMEB). Срезы хранили в 0,1%-м растворе NaN_3 в PBS.

2.21 Иммуногистохимическое окрашивание тонких срезов антителами, специфичными к бета-амилоиду

Детектирование амилоидных (A β)-бляшек в тонких срезах осуществляли при помощи метода иммуногистохимического окрашивания. Для этого срезы сначала промывали в PBS с 0,25%-м содержанием детергента Triton X-100, затем блокировали 5%-м BSA, разведенным в PBS, содержащем 0,25% Triton X-100. После этого срезы инкубировали одну ночь в растворе первичных антител 6E10 (1:1000, раствор в PBS с 5%-м содержанием BSA и 0,125%-м содержанием Triton X-100). Первичные антитела 6E10 распознают аминокислотные остатки 1 – 16 в A β . После первичных антител срезы инкубировали два часа с вторичными антителами Alexa

Fluor-594 (anti-mouse AlexaFluor 594, Invitrogen), растворенными в отношении 1:1000 в PBS с 5%-м содержанием BSA и 0,125%-м содержанием Triton X-100. После окрашивания необходимые области срезов фотографировали при помощи конфокального микроскопа (Thorlabs, США) с использованием 20-кратного объектива (UPlanSApo 20x/0.85 Oil, OLYMPUS).

2.22 Анализ количества амилоидных бляшек в срезах мозга

После регистрации Z-серии снимков (21 кадр, сделанный в плоскости XY через 0,1 мкм по Z-оси, площадь каждого – 491 990 мкм²), полученных с конфокального микроскопа, использовали программу ImageJ, с помощью которой эти снимки суммировали по интенсивности. В результате с каждой Z-серии было получено более четкое и качественное изображение каждой области. Далее эти изображения анализировали с использованием программы Icy (создана исследовательской группой Quantitative Image Analysis Unit в Институте Пастера (Париж, Франция)), которая определяла площадь, занимаемую бляшками – Spl, (мкм)². Для данной операции была использована функция Spot Detector.

2.23 Подготовка срезов гиппокампа

После декапитации мышей, их мозг быстро извлекался. Из него удаляли мозжечок и небольшой участок лобной коры. Плоская поверхность для крепления мозга была создана путем среза на дорсальной поверхности, параллельной горизонтальной плоскости. Затем мозг устанавливали в вибраторе HM 650V (MicromInternational, Германия), и делали горизонтальные срезы толщиной 400 мкм в холодном (0°C) ACSF с добавлением глюкозы (10 мМ), при барботировании карбогеном (95% O₂/ 5% CO₂). Готовые срезы погружали в камеру с аэрированным ACSF и помещали в водяную баню с постоянной температурой 35°C в течение 1 часа. После инкубации срезы переносили в записывающую камеру, где их выдерживали в течение 15-20 мин перед электрофизиологическим исследованием. В этой камере срезы гиппокампа перфузировали постоянным притоком оксигенированного ACSF со скоростью 5 мл/мин при комнатной температуре. В эксперименте использовали от одного до пяти срезов от каждой мыши. Исследовали 2 возрастные группы мышей – двухмесячные и шестимесячные. В каждой группе в качестве контроля использовали мыши дикого типа (WT) из того же помета.

2.24 Электрофизиологические эксперименты по записи долговременной потенциации (ДВП)

Полевые (внеклеточные) возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) регистрировали в СА1 области *stratum radiatum* с использованием стеклянных микроэлектродов (0,2-1,0 МОм), заполненных ACSF. Синаптические ответы вызывали местной внеклеточной стимуляцией коллатералей Шаффера с использованием вольфрамовых биполярных электродов (Microprobes for Life Science, США), помещенных в *stratum radiatum* на границе СА1 и СА2 областей. Стимуляцию проводили с помощью прямоугольных парных импульсов (длительность 0,1 мс, межимпульсный интервал 50 мс) каждые 20 с. Зависимость амплитуды полевого потенциала ответа от силы стимуляции определяли увеличением интенсивности тока от 20 до 200 мкА через изолятор стимулятора А365 (WPI, США). Интенсивность стимула, использованная в эксперименте, была выбрана так, чтобы амплитуда пВПСП составляла 40-50% от амплитуды, когда популяционный спайк появлялся впервые. Сила стимуляции была неизменной во время экспериментов и составляла 50-150 мкА. Для каждого пВПСП измеряли амплитуду и наклон фазы нарастания на уровне 20-80% от амплитуды пика. Индукция ДВП проводили только в том случае, если в течение 20 мин была зарегистрирована стабильная амплитуда базовой линии пВПСП. ДВП индуцировали по протоколу стимуляции тета-всплеска (theta-burst stimulation, TBS), состоящим из пяти всплесков по пять импульсов 100 Гц с интервалом 200 мс между всплесками, применяемым пять раз через каждые 10 с. пВПСП записывали по протоколу индукции в течение 40 мин. Ответы усиливали при помощи микроэлектродного АС усилителя модели 1800 (А-М Systems, США), затем оцифровывали и записывали на персональный компьютер с использованием ADC/DAC NI USB-6211 (National Instruments, США) и программного обеспечения (WinWCP v5.2.2, США). Электрофизиологические данные анализировали с помощью программы Clampfit 10.2 (Axon Instruments, США). Для измерения ДВП в срезе базовая линия пВПСП и потенцированный пВПСП (записанный через 30-40 минут после TBS) усредняли по-отдельности. Значение синаптической пластичности рассчитывали как отношение наклона фазы нарастания в усредненном потенцированном пВПСП и наклона усредненной базовой линии пВПСП. Чтобы определить влияние соединения 51164 на ДВП, перед экспериментом срезы предварительно инкубировали 30 минут в 100 нМ растворе 51164.

2.25 Модель экспериментальной ишемии

Ишемию головного мозга моделировали на анестезированных животных (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг) методом односторонней окклюзии среднемозговой артерии по методу J. Koizumi [141].

2.26 Анализ когнитивных функций животных (тест «лабиринт Барнс»)

Тест «лабиринт Барнс» чувствителен к нарушениям у грызунов с гиппокампальными повреждениями. В основе теста лежит физиологически обусловленное стремление крыс избегать ярко-освещенного открытого пространства путем поиска «норки» (targetbox). Эксперимент проводили на установке «Лабиринт Барнс для крыс» (ООО «НПК Открытая наука», Россия) по протоколу описанному ранее [205]. Выбор доз изучаемых соединений был сделан на основании проведенных ранее экспериментов. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентных количествах (1 мл/200г массы). В течение 4-х дней перед моделированием ишемии головного мозга проводили обучение животных. Перед началом обучения каждую крысу помещали в target box и оставляли там на 2 минуты. Затем животных по очереди помещали в центр лабиринта, накрывая темной коробкой. По истечении 10 секунд коробку поднимали и записывали поведение крысы в течение 3-х минут. За отведенное время животное должно было найти target-box, при этом подсчитывались время её нахождения и количество ошибок. В случае, если крыса не справлялась с заданием, по прошествии 3 минут запись выключалась, а испытуемое животное мягко подталкивалось к targetbox и оставалось там также на 2 минуты. Данная процедура повторялась ежедневно в течение 4-х дней, интервал между попытками составлял 15-20 минут.

2.27 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного пакета Statistica 8.0 (StatSoft, USA) и OriginPro 8. Данные представлены в виде: среднее значение (Mean) ± стандартная ошибка среднего (SEM), либо в виде среднее значение (Mean) ± стандартное отклонение (SD). Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности

распределения. Сравнения двух групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента (при условии нормального распределения в выборках), и Kruskal-Wallis ANOVA – при несоблюдении условий нормальности распределения. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали при сравнении трех и более групп с одной переменной. Для оценки взаимосвязи двух переменных (например, Генотип x Возраст; Вводимое вещество x Наличие токсичности (Аβ) применяли двухфакторный ANOVA. Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью post-hoc Tukey's или Dunn-Sidak's тестов множественных сравнений. Различия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Разработка модели низкой амилоидной синаптотоксичности

Первичную культуру гиппокампа получали из новорожденных мышат (P0-3) дикого типа (WT) по протоколу [243, 286]. Нейроны гиппокампа поддерживали в культуре до 14-16 дня *in vitro* (DIV, days *in vitro*). Для достижения условий амилоидной токсичности использовали растворимые амилоидные олигомеры, которые, как было продемонстрировано ранее, оказывают синаптотоксическое действие при БА [57, 102, 140, 150, 180, 267, 273]. Растворимые амилоидные олигомеры получали из синтетических пептидов A β 42, следуя ранее описанным процедурам [291] (подробности см. в главе 2 «Объекты и методы исследования»). Олигомерное состояние полученного препарата A β 42 было подтверждено с помощью анализа на атомно силовом микроскопе (АСМ), а также с помощью экспериментов с вестерн-блоттингом в SDS-геле (Рисунок 10). По данным АСМ олигомеры A β 42 проявляются в виде глобулярных структур с высотой 1-2 нм и шириной около 10 нм (Рисунок 10 А). Эксперименты вестерн-блоттинга показали, что препарат A β 42 находится в основном в олигомерной форме и его молекулярная масса составляет около 26 кДа (Рисунок 10 Б), что соответствует пентамерам или гексамерам [9]. Для имитации физиологических условий использовали низкие концентрации (100 нМ, рассчитанные на основе начального количества пептидов, использованных для получения олигомеров) A β 42. Пептиды A β 40 готовили так же, как пептиды A β 42 (Рисунок 10). В экспериментах использовали эквивалентные количества пептидов A β 42 и A β 40. Приготовленные олигомеры A β 42 и A β 40 добавляли к первичным культурам нейронов гиппокампа на DIV11. В контрольных экспериментах гиппокампальные культуры обрабатывали эквивалентным (по отношению к добавляемому к культурам объему олигомеров A β 42 и A β 40) количеством питательной среды. Синаптотоксический эффект, а также влияние A β на кальциевый сигналинг изучали на DIV14-16.

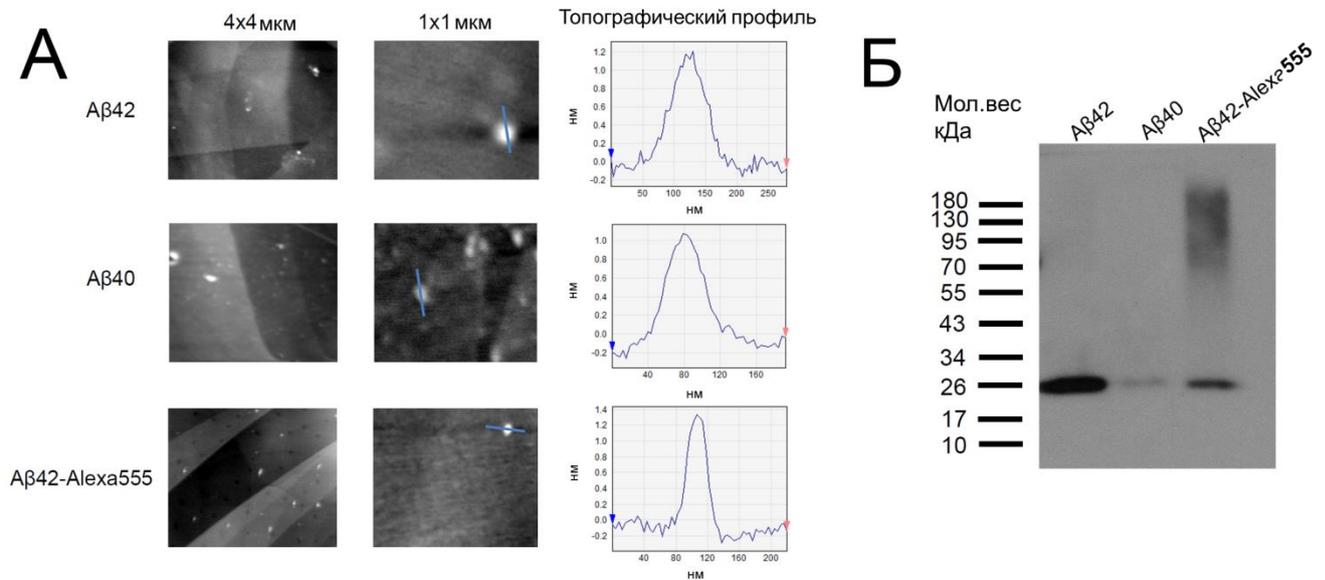


Рисунок 10 Характеристика олигомерного состояния Aβ42, Aβ40 и Aβ42-Alexa555. (А) Микрофотографии образцов Aβ42, Aβ40 и Aβ42-Alexa555 полученные при помощи атомно силовой микроскопии. Образцы Aβ42, Aβ40 и Aβ42-Alexa555 предварительно выдерживали при 4°C в течении 24 ч., затем наносили на подложку. В качестве подложки использовался графит. На рисунке представлен топографический профиль каждого Aβ образца (измеренная глобула помечена голубой линией). Все образцы с Aβ визуализировались на подложке в виде глобулярных структур. Высота Aβ42 составляла $1,56 \pm 0,3$ нм, диаметр на ПШПВ до деконволюции $75 \pm 0,6$ нм, диаметр на ПШПВ после деконволюции $9,6 \pm 0,1$ нм. Для Aβ40 размеры составляли: $0,9 \pm 0,1$ нм / $43 \pm 0,3$ нм / $7,3 \pm 0,1$ нм. Для Aβ42-Alexa555 размеры составляли: $1,46 \pm 0,2$ нм / $68 \pm 0,6$ нм / $8,9 \pm 0,1$ нм, n (экспериментов) = 3. **(Б)** Фракции надосадочной жидкости образцов Aβ42, Aβ40 и Aβ42-Alexa555 разделяли при помощи 15% Acrylamide/Bis SDS геля и анализировали Вестерн блотом с использованием anti-Aβ 6E10 моноклональных антител, n (экспериментов) = 3.

3.1.1 Исследование роли кальциевой дисрегуляции в изменении морфологии дендритных шипиков на модели низкой амилоидной токсичности

Функциональное соответствие модели амилоидной токсичности, обусловленной низкой концентрацией Aβ40 и Aβ42 анализировали по восприимчивости культивируемых нейронов гиппокампа к глутаматной (Glu) эксайтотоксичности после инкубации с олигомерными амилоидами (oAβ) методом кальциевого имиджинга. Глутаматная эксайтотоксичность – патологический процесс, ведущий к гибели нейронов под воздействием нейромедиатора глутамата, способного гиперактивировать NMDA и AMPA рецепторы. При эксайтотоксичности

происходит резкое увеличение внутриклеточной концентрации кальция, что вызывает активацию ряда ферментов, разрушающих цитозольные структуры и приводит к запуску апоптоза. В настоящей работе установлено, что инкубация с $\text{oA}\beta 42$ и $\text{oA}\beta 40$ значительно повышает восприимчивость нейронов к Glu эксайтотоксичности (Рисунок 11 А, Б), что согласуется с данными литературы [107].

В условиях созданной модели оценивали роль ионотропных NMDA рецепторов в установленном увеличении Glu эксайтотоксичности при инкубации с $\text{oA}\beta 40$, $\text{oA}\beta 42$. Показано, что при блокаде NMDAR ионами магния в концентрации 10 мМ, чувствительность нейронов, обработанных $\text{oA}\beta 42$, $\text{oA}\beta 40$ к Glu эксайтотоксичности, снижалась (Рисунок 12).

Полученные результаты подтверждают функциональность модели и возможность ее использования для изучения влияния $\text{oA}\beta$ на внутриклеточную передачу кальциевых сигналов.

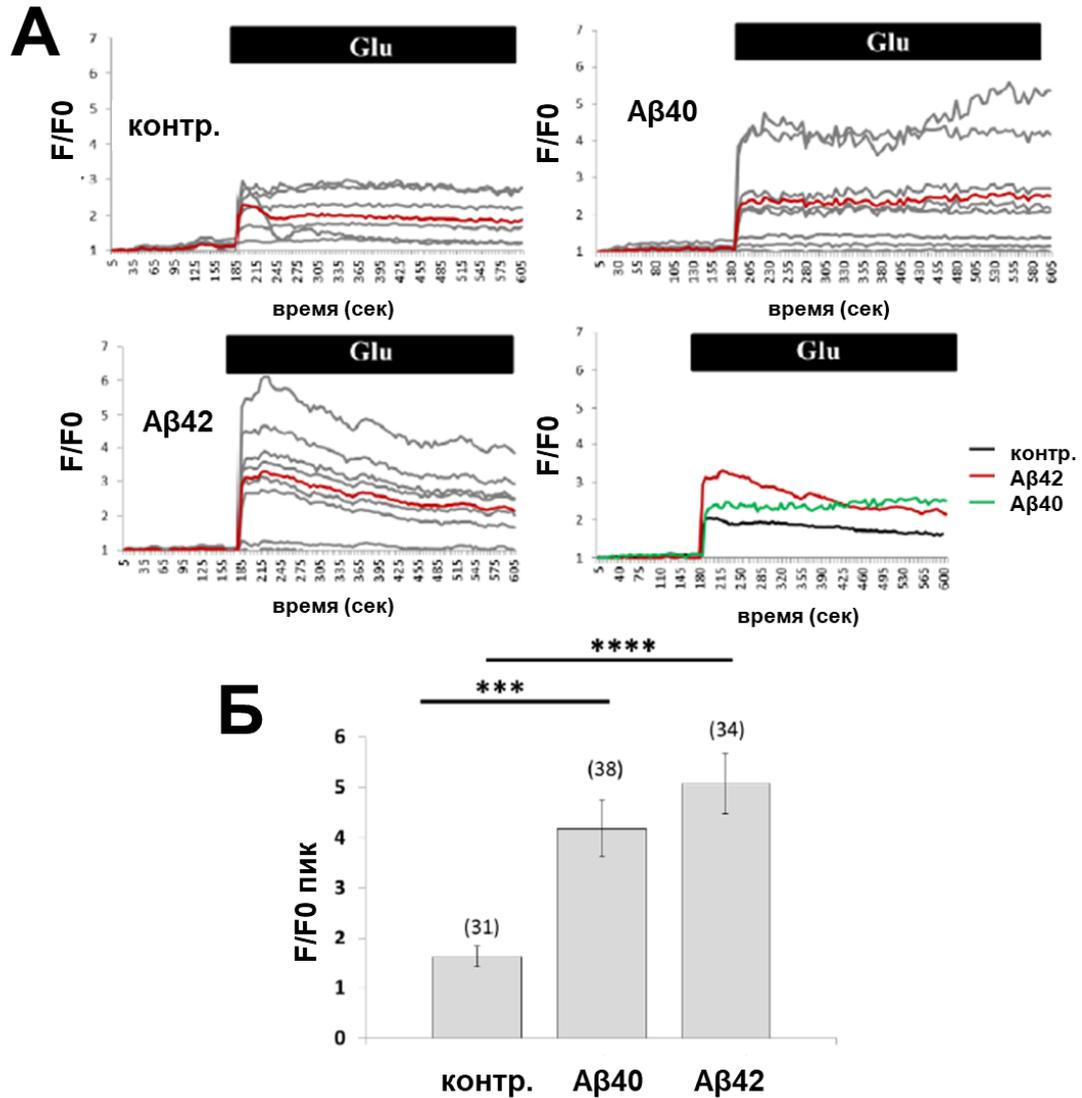


Рисунок 11 Aβ40 и Aβ42 в концентрации 100 нМ увеличивают восприимчивость нейронов к глутаматной (Glu) эксайтотоксичности. (А) График временной зависимости изменения флуоресценции кальций чувствительной краски Fluo-3AM (F/F0) в соме нейронов гиппокампа. Серым цветом выделены кривые соответствующие изменениям флуоресценции в отдельных клетках. Красным цветом выделена усредненная по всем клеткам кривая изменения флуоресценции Fluo-3AM. Временные зависимости изменения флуоресценции Fluo-3AM показаны для нейронов гиппокампа дикого типа обработанных 100нМ Aβ40, либо 100нМ Aβ42 либо оставлены без воздействия, контроль (контр.) (добавлен равный объем питательная среды). (Б) Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (F/F0 пик) в контрольных клетках (контр.) и в клетках подвергшихся воздействию Aβ40 либо Aβ42. Результаты представлены в виде среднее значение ± стандартная ошибка среднего (количество проанализированных клеток (n) указано в скобках над столбцами). *** p < 0,001, **** p < 0,0001 по критерию Стьюдента.

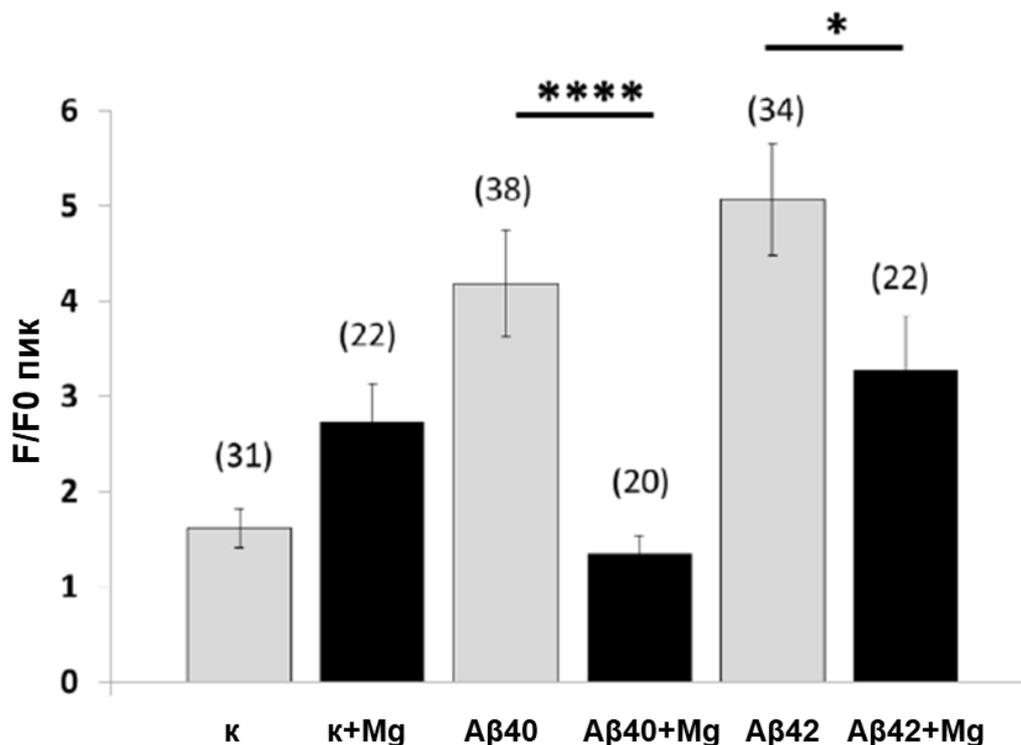


Рисунок 12 NMDA-рецепторы участвуют в Aβ-индуцированной восприимчивости нейронов гиппокампа к глутаматной эксайтотоксичности. Средний пик (Fluo-3AM F/FO) нейрональных ответов, рассчитанный для нейронов гиппокампа дикого типа после воздействия на них 100нМ Aβ40, 100нМ Aβ42 или контроля (питательная среда) в присутствии или отсутствии ионов Mg²⁺. Средний пик нейрональных ответов в соме рассчитанный для каждой группы, количество проанализированных клеток (n) из трех независимых экспериментов показано в скобках над столбцами. К - контроль, клетки, обработанные питательной средой. Результаты представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего; * p < 0,05, **** p < 0,0001 по критерию Стьюдента.

Известно, что амилоид бета изменяет активность ЭПР-резидентных кальциевых каналов [82, 122]. Оценка влияния низкой (100нМ) концентрации Aβ42 на содержание кальция в ЭПР нейронов гиппокампа проведена по визуализации кальциевых осцилляций в соме нейронов. Выброс кальция из депо ЭПР вызывали добавлением 3 мкМ иономицина (ИО, ионофор проникающий через клеточные мембраны). Установлено, что инкубация нейронов с Aβ42 в концентрации 100нМ статистически значимо (p < 0,01) способствует накоплению ионов кальция в ЭПР нейронов гиппокампа (Рисунок 13).

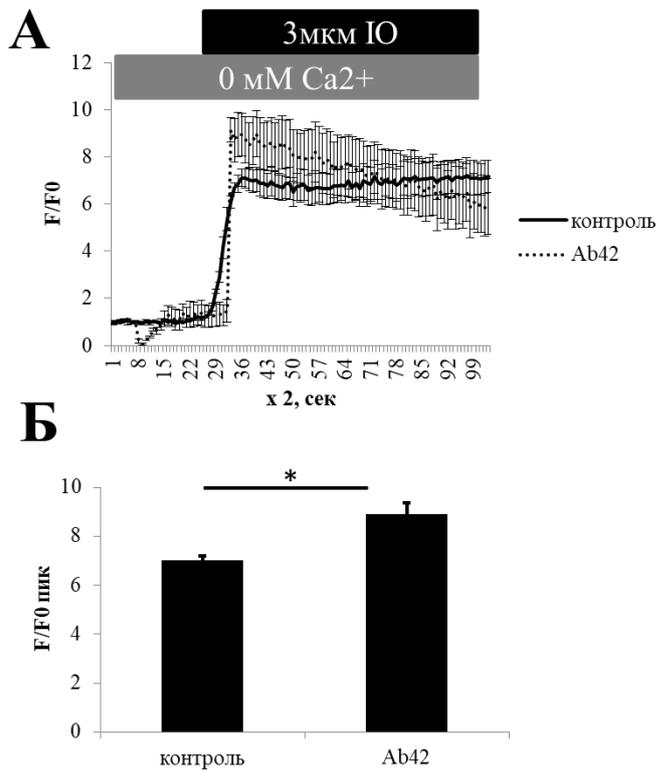


Рисунок 13 Aβ42 в концентрации 100нМ повышает содержание ионов кальция в эндоплазматическом ретикулуме первичных нейронов гиппокампа. **(А)** График временной зависимости флуоресценции Fluo-3AM в первичных нейронах гиппокампа в присутствии Aβ42, либо в его отсутствии (контроль). **(Б)** Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (F/F0 пик) в экспериментальных группах. n (клеток) = 30-40.

Далее было исследовано влияние Aβ42 на активность депо-управляемых кальциевых каналов в дендритных шипиках первичной культуры гиппокампа. Установлено, что инкубация нейронов с 100нМ Aβ42 статистически достоверно ($p < 0,05$) снижает активность постсинаптического депо-управляемого входа кальция (Рисунок 14).

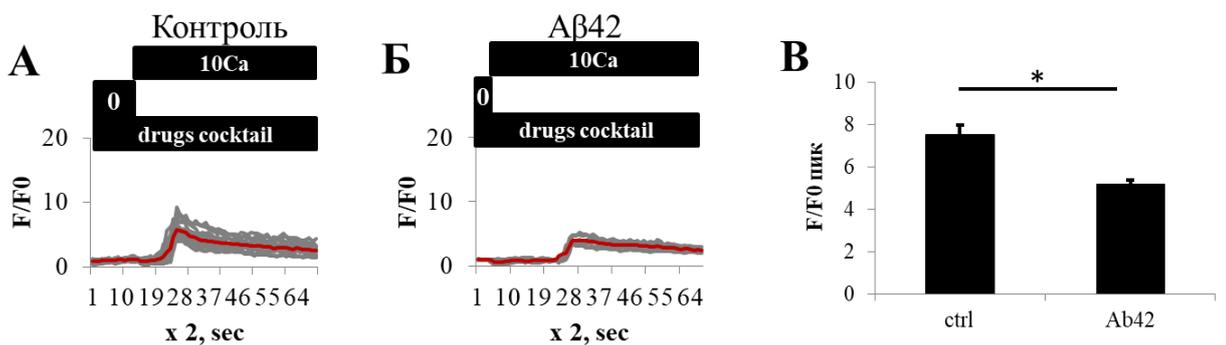


Рисунок 14 Постсинаптический нейрональный депо-управляемый вход кальция снижен в нейронах гиппокампа обработанных Aβ42. **(А, Б)** Временные зависимости изменения интенсивности флуоресценции генетически кодируемого кальциевого индикатора GCaMP5.3 в постсинаптических дендритных шипиках нейронов гиппокампа в контрольных условиях **(А)** и в присутствии 100нМ Aβ42. **(В)** Сравнительный анализ изменения амплитуды

кальциевого ответа (F/F₀ пик) в экспериментальных группах. n (шипики) = 30-40. Drugs cocktail: TTX, D-AP5, нифедипин, тапсигаргин, CNQX.

Для оценки состояния синаптогенеза в условиях низкой амилоидной токсичности *in vitro* на 14 день культивирования нейроны были зафиксированы, пермеабелизированы и окрашены на нейрональный маркер MAP2 и синаптический маркер синапсин (Synapsin I) (Рисунок 15 А). Установлена значительная потеря окрашивания синапсина в культурах, подвергнутых воздействию олигомеров A β 42 в концентрации 100нМ. (Рисунок 15 А, Б). Полученные результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями [150, 212, 273].

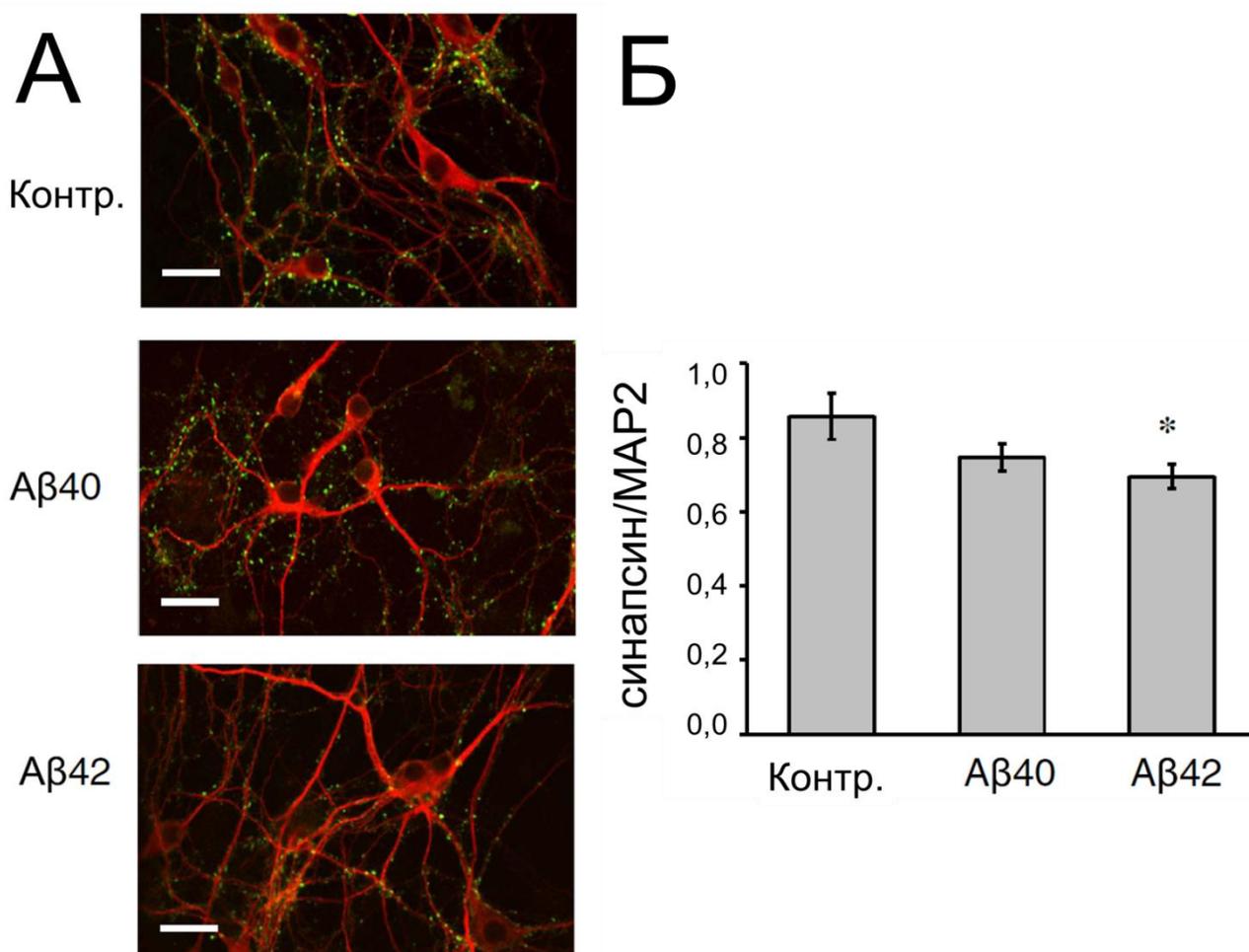


Рисунок 15 Синаптотоксические эффекты амилоидных олигомеров в концентрации 100 нМ в первичной нейрональной культуре. (А) Иммуноцитохимический анализ экспрессии синаптического маркера Синапсин I (зеленый) и нейронального маркера MAP2 (красный) в первичной культуре гиппокампа без воздействия (Контр.-контроль) либо обработанной олигомерами A β 40 или A β 42. Масштабная линейка соответствует 20 мкм. **(Б)** Средняя интенсивность флуоресценции Синапсина I была нормирована на среднюю интенсивность флуоресценции MAP2 для культуры без воздействия (контроль) либо обработанной A β 40 либо

A β 42. На гистограмме приведены усредненные результаты трех независимых экспериментов. Значения представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$ по данным однофакторного ANOVA.

Следующим этапом проверки адекватности разработанной модели было изучение изменений морфологии дендритных шипиков нейронов культуры гиппокампа при воздействии олигомерами A β 40 и A β 42 в концентрации 100нМ. Грибовидные шипики составляли 35% от общего количества шипиков в контрольных культурах (Рисунок 16 А, Б). Добавление олигомеров A β 40 в концентрации 100 нМ не оказывало статистически значимого влияния на процент грибовидных шипиков в нейрональных культурах (Рисунок 16 А, Б). Напротив, добавление олигомеров A β 42 в концентрации 100 нМ приводило к значительному снижению процента грибовидных шипиков (Рисунок 16 Б). В среднем процент грибовидных шипиков был снижен до 20% в культурах, обработанных олигомерами A β 42 (Рисунок 16 Б). После обработки A β 42 доля пеньковых шипиков увеличилась с 35 до 50%, а доля тонких шипиков осталась постоянной на уровне 26% (Рисунок 16 Б). Сдвиг от грибовидных к тонким шипикам, вызванный воздействием олигомеров A β 42, согласуется с результатами, полученными на органотипических срезах гиппокампа на трансгенной модели APP_{SLD} [246].

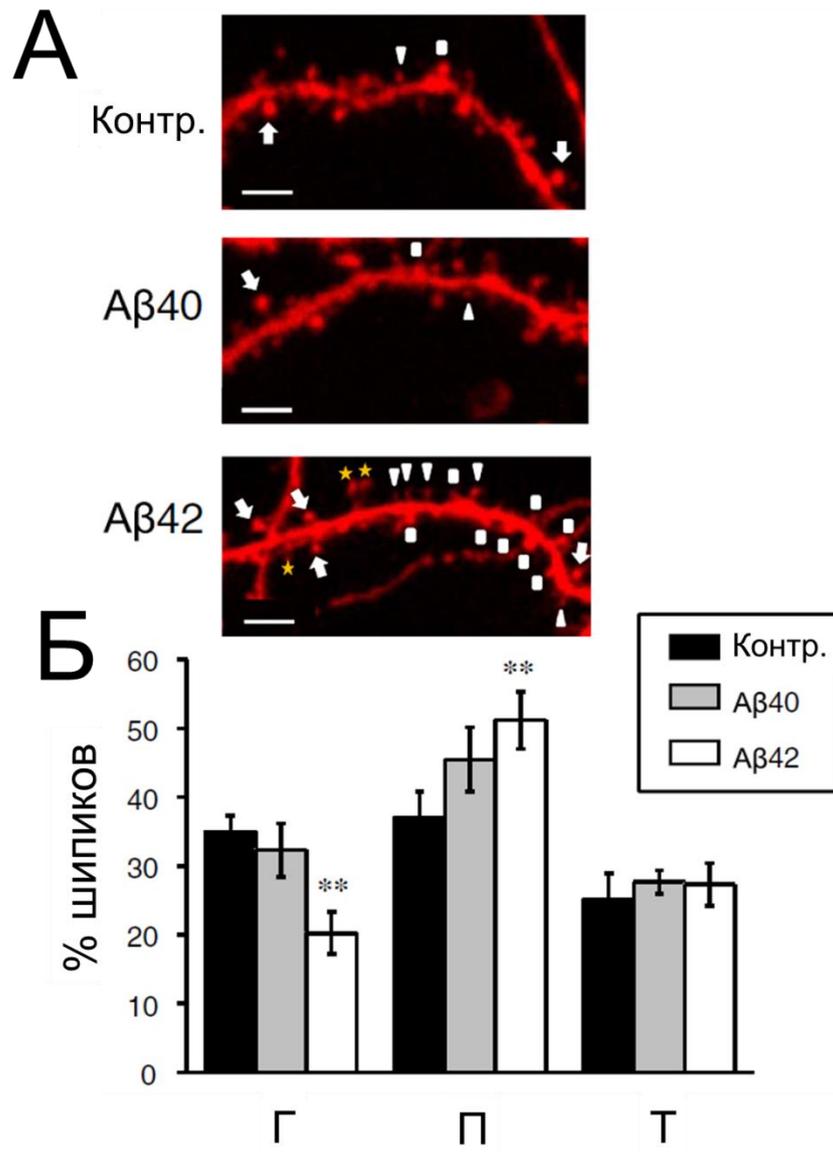


Рисунок 16 Амилоидные олигомеры вызывают гибель гиппокампальных грибовидных шипиков *in vitro*. (А) Репрезентативные конфокальные микрофотографии первичных нейронов гиппокампа мышей дикого типа трансфицированных плазмидой TD-Tomato. Репрезентативные микрофотографии показаны для культур без воздействия (Контр.-контроль), для культур обработанных либо 100 нМ Aβ40 либо 100 нМ Aβ42. Масштабная линейка соответствует 5 мкм. На микрофотографии соответствующей культуре клеток обработанных Aβ42 помечены все типы шипиков использованные для анализа. Грибовидные шипики стрелкой, тонкие треугольником, пеньковые квадратом. Дендритные элементы, которые не включались в анализ помечены желтой звездой. (Б) Средний процент грибовидных (Г), пеньковых (П) и тонких (Т) в культурах без воздействия (контроль), в присутствии либо 100 нМ Aβ40 либо 100 нМ Aβ42. Для количественного анализа было проанализировано n (нейронов) = 8–10 (для каждой экспериментальной группы). Значения представлены в виде среднее ±

стандартная ошибка среднего. ** $p < 0,005$ по данным однофакторного ANOVA с последующими post hoc тестами.

Таким образом, модель низкой амилоидной токсичности позволяет оценивать эффекты олигомерных бета-амилоидов на формирование дендритных шипиков, дестабилизация которых зависит от клеточной мишени – депо-управляемых кальциевых каналов.

3.2 Молекулярно-биологическое обоснование участия депо-управляемых кальциевых каналов в поддержании морфологии дендритных шипиков *in vitro* и *in vivo*

3.2.1 Экспрессия сенсора концентрации ионов кальция в ЭПР – стромальной молекулы взаимодействия 2 - снижается в ответ на добавление амилоидных олигомеров *in vitro*

Ранее было показано, что стабильность грибовидных шипиков зависит от уровня экспрессии стромальной молекулы взаимодействия 2 (STIM2) и, следовательно, от STIM2-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) и постоянной активности Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) [243].

Чтобы выяснить, влияет ли воздействие олигомерами амилоида бета на экспрессию белка STIM2 в культурах гиппокампа, мы провели серию экспериментов по вестерн-блоттингу с лизатами, приготовленными из контрольных культур, и культур, обработанных олигомерами A β 40 и A β 42 в концентрации 100нМ. В этих экспериментах наблюдали 20% снижение уровня экспрессии белка STIM2 в культурах, обработанных A β 40 и A β 42 (Рисунок 17 А, Б) и 30% снижение уровня экспрессии аутофосфорилированной формы CaMKII (pCaMKII) в культурах, обработанных A β 42 (Рисунок 17 А, Б). Уровни экспрессии белка STIM1 и уровни экспрессии общей CaMKII не менялись в культурах, обработанных A β 40 или A β 42 (Рисунок 17 А, Б). Примечательно, что избирательное снижение экспрессии STIM2 и снижение уровня экспрессии pCaMKII сходны с изменениями, наблюдавшимися в предыдущих экспериментах с нейронами полученных от мышей линии PS1-M146V-KI [243], что позволяет предположить, что схожие сигнальные пути нарушаются в синаптических шипиках в условиях низкой амилоидной токсичности.

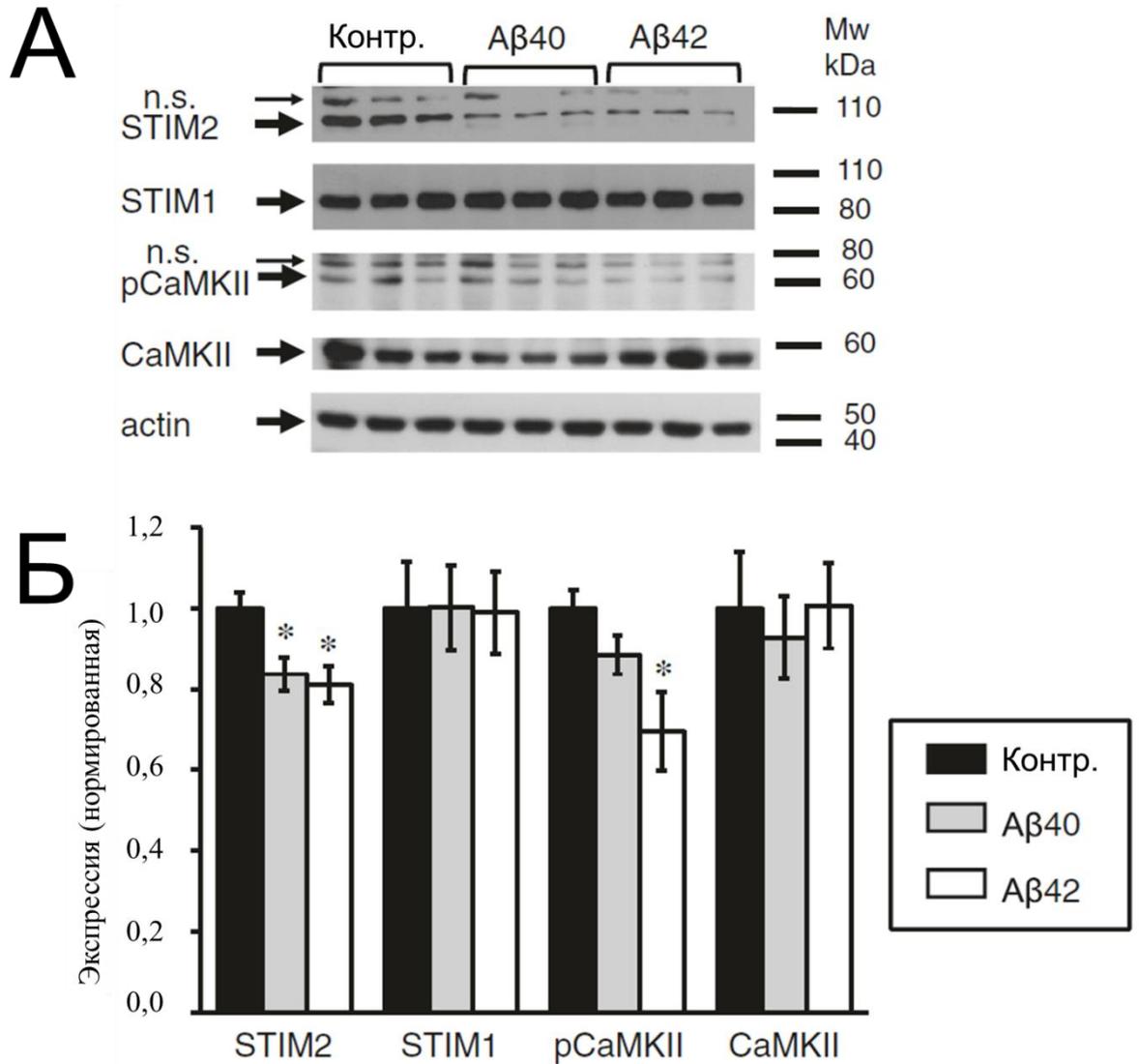


Рисунок 17 Экспрессия белков STIM2 и pCaMKII снижена в присутствии амилоида в культурах гиппокампа. (А) Уровни экспрессии белков STIM2, STIM1, pCaMKII и CaMKII анализировали с помощью метода Вестерн-блот. Культуры гиппокампа не обрабатывались (Контр. - контроль) либо подвергались воздействию олигомеров Aβ40 или Aβ42 в концентрации 100 нМ. Актин был использован в качестве контроля нагрузки образцов на гель. (Б) Количественное определение уровней экспрессии белков STIM2, STIM1, pCaMKII и CaMKII в культурах гиппокампа, подвергнутых воздействию 100нМ Aβ40, 100 нМ Aβ42 или без воздействия (Контр.) (уровень экспрессии каждого белка нормализован на соответствующий уровень экспрессии актина). График представляет данные из трех независимых экспериментов. Значения показаны как среднее ± стандартная ошибка среднего. *: $p < 0,05$ по односторонним и специальным тестам ANOVA, n.s. (не специфично).

3.2.2 Гиперэкспрессия стромальной молекулы взаимодействия 2 защищает грибовидные шипики от синаптотоксического действия амилоидных олигомеров *in vitro*

Показано, что экспрессия STIM2 и активация синаптического пути нДУВК приводят к восстановлению процента грибовидных шипиков в нейронах PS1-M146V-K1 [243]. Мы предположили, что данный сигнальный путь может быть включен в защиту грибовидных шипиков от амилоидной токсичности. Для подтверждения гипотезы нейроны гиппокампа на DIV7 совместно трансфецировали плазмидой, кодирующей экспрессию флуоресцентного белка TD-Tomato, и плазмидой, кодирующей мышинный STIM2 (mSTIM2). На DIV11 клетки обрабатывали либо олигомерами A β 42 либо равным количеством питательной среды (контроль). Нейроны были зафиксированы на DIV14, морфологию дендритных шипиков визуализировали на конфокальном микроскопе (Рисунок 18 А). Аналогично результатам представленным на рисунке 16, мы обнаружили, что добавление олигомеров A β 42 приводило к значительному сокращению процента грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа (Рисунок 18 А, Б). Показано, что экспрессия STIM2 не влияет на процент грибовидных шипиков в контрольных культурах, но приводит к полному восстановлению процента грибовидных шипиков в культурах, обработанных A β 42 (Рисунок 18), что позволяет заключить, что гиперэкспрессия STIM2 может защитить грибовидные шипики гиппокампа от синаптотоксического действия A β 42.

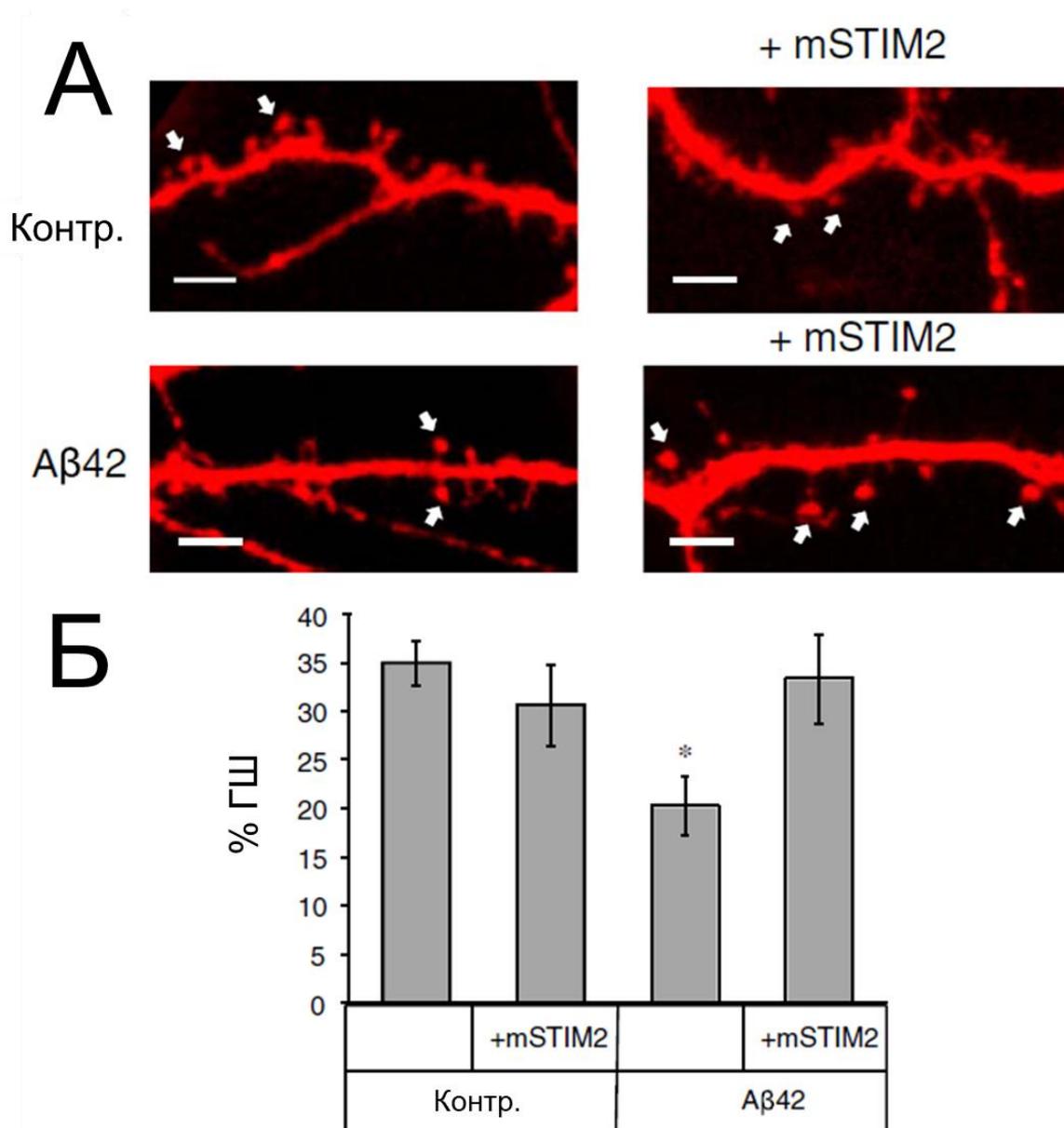


Рисунок 18 Гиперэкспрессия STIM2 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности *in vitro*. (А) Первичные культуры гиппокампа совместно трансфецировали плазмидами TD-Tomato и mSTIM2 либо трансфецировали только TD-Tomato. После трансфекции клетки обрабатывали олигомерами Аβ42 в концентрации 100 нМ или оставляли без воздействия (Контр.). Визуализация морфологии дендритных шипиков осуществлялась на конфокальном микроскопе. Масштабная линейка соответствует 5 мкм. Грибовидные шипики обозначены на микрофотографии стрелкой. (Б) Процент грибовидных шипиков (ГШ) в культурах гиппокампа, совместно трансфецированных TD-Tomato и mSTIM2 либо трансфецированных только TD-Tomato. Данные получены из трех различных культур. Для количественного определения процента грибовидных шипиков было проанализировано $n = 6-8$ нейронов (для каждой экспериментальной группы из одного эксперимента). Эксперимент был

повторен три раза. Значения показаны как среднее \pm стандартная ошибка среднего. *: $p < 0,05$ по критерию Стьюдента.

Таким образом, доказано, что в *in vitro* модели низкой амилоидной токсичности процент грибовидных шипиков зависит от уровня экспрессии белка резидента ЭПР – STIM2. Гиперэкспрессия белка STIM2 может повысить активность депо-управляемых кальциевых каналов и защитить дендритные шипики от амилоидной токсичности *in vitro*.

3.2.3 Влияние амилоидных олигомеров на потерю грибовидных шипиков *in vivo*

Потеря грибовидных шипиков *in vivo* под влиянием амилоидных олигомеров исследована на мышах. Синтетические олигомеры A β 42, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa-555, стереотаксически инъектировали в дозе 5,4 мг/кг в область CA1 2-месячных мышей линии M (Thy1-GFP) [79]. Мышам контрольной группы вводили вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa-555. Через шесть недель после инъекций анализировали морфологию дендритных шипиков в срезах гиппокампа с помощью двухфотонной микроскопии. Установлено, что инъекция олигомеров A β 42 приводила к значительному снижению общей плотности дендритных шипиков (Рисунок 19 Б). Процент грибовидных шипиков был значительно снижен, а доля пеньковых шипиков значительно увеличена в области CA1 (*stratum radiatum*) гиппокампа опытной группы по сравнению с контролем (Рисунок 19 В). Процент тонких шипиков не изменялся (Рисунок 19 В). Сдвиг от грибовидных к пеньковым шипикам, наблюдаемый в экспериментах в ответ на инъекцию олигомеров A β 42, аналогичен результатам, полученным в наших экспериментах с первичной культурой (Рисунок 16), и согласуется с литературными данными [246].

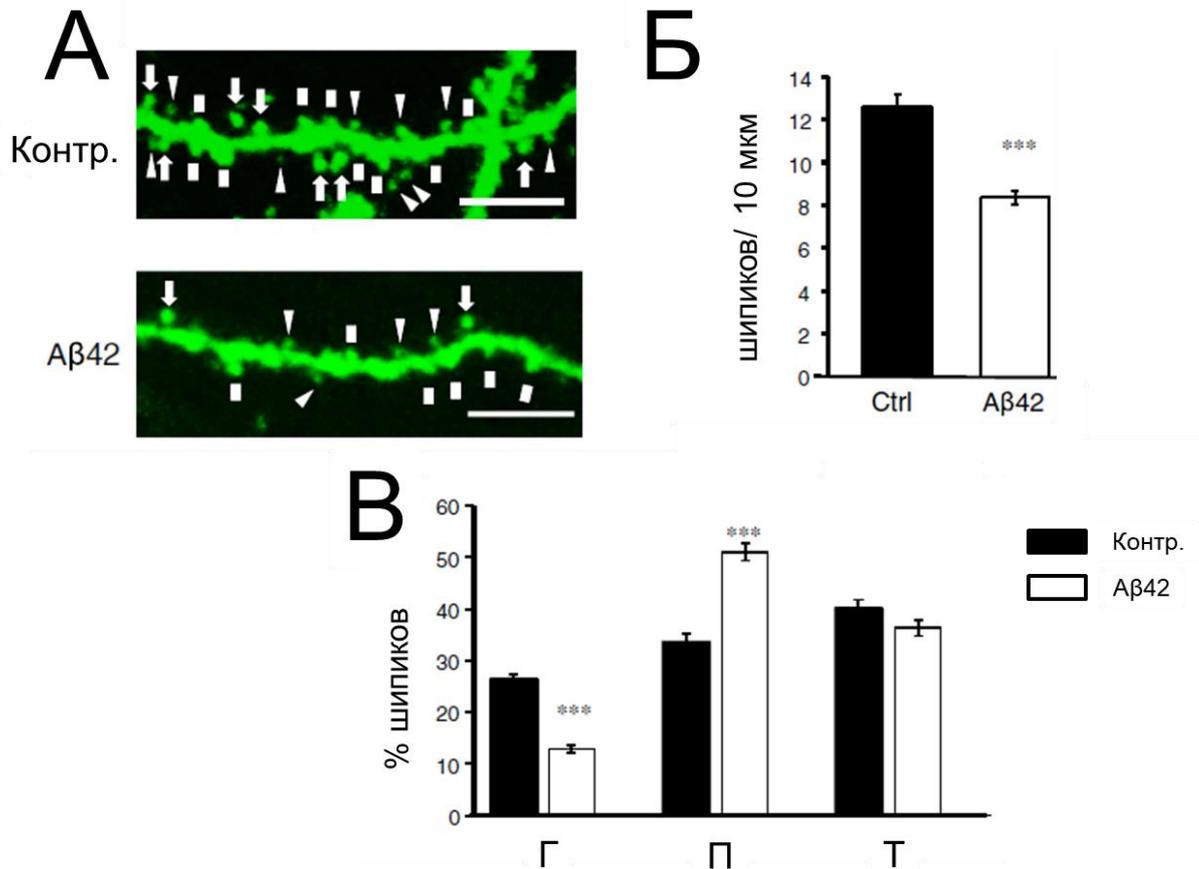


Рисунок 19 Влияние олигомеров Аβ42 на дендритные шипики *in vivo*. **(А)** Морфология дендритных шипиков нейронов гиппокампа мышей линии М в возрасте 3,5 мес. после инъекции олигомерных форм Аβ42 дозе 5,4 мг/кг в СА1 область и контрольных мышей после инъекций вторичных антител в СА1 область. Визуализация морфологии шипиков осуществлялась на двухфотонном микроскопе. Масштабная линейка соответствует 5 мкм. На панели Контр. указаны все типы шипиков взятых на количественный анализ: Г (грибовидный) со стрелкой, Т (тонкий) с треугольником и П (пеньковый) с квадратом. **(Б, В)** Общая плотность шипиков и процентное соотношение грибовидных, тонких и пеньковых шипиков в нейронах из области гиппокампа СА1. График представляет данные трех независимых экспериментов с контрольными мышами и мышами, которым вводили Аβ42. Для количественного определения шипиков были проанализированы $n = 21-30$ нейронов. Значения показаны как среднее \pm стандартная ошибка среднего. ***: $p < 0,0005$ по критерию Стьюдента.

3.2.4 Инъекция олигомеров A β 42 вызывает подавление экспрессии стромальной молекулы взаимодействия 2 в гиппокампе *in vivo*

Исследование влияния A β 42 на экспрессию белков *in vivo* выполнено при помощи Вестерн-блот анализа лизатов гиппокампа мышей дикого типа после введения олигомеров A β 42 в дозе 5,4 мг/кг. В качестве контроля использовали мышей, которым инъецировали вторичное антитело. В соответствии с данными, полученными на культуре нейронов гиппокампа (Рисунок 17), мы наблюдали 20% снижение уровня экспрессии белка STIM2 в гиппокампе мышей, которым инъецировали олигомеры A β 42 в дозе 5,4 мг/кг (Рисунок 20 А, Б). Также в соответствии с данными, полученными на культуре клеток (Рисунок 17), мы наблюдали снижение уровня экспрессии pCaMKII на 45% после инъекции олигомеров A β 42 в гиппокамп мышей (Рисунок 20 А, Б). Уровень экспрессии белка STIM1 был снижен менее чем на 5%, а уровень общей CaMKII не изменялся у мышей, которым инъецировали A β 42 (Рисунок 20 А, Б). Уровень экспрессии белка PSD95 также снижался на 40% в гиппокампе мышей, которым инъецировали A β 42 (Рисунок 20 А, Б). Статистически значимое снижение уровней экспрессии белков PSD95 и pCaMKII в экспериментах на мышах линии М согласуется с потерей грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа мышей, которым инъецировали олигомеры A β 42, и с ранее опубликованными данными на мышах PS1-M146V-KI [243].

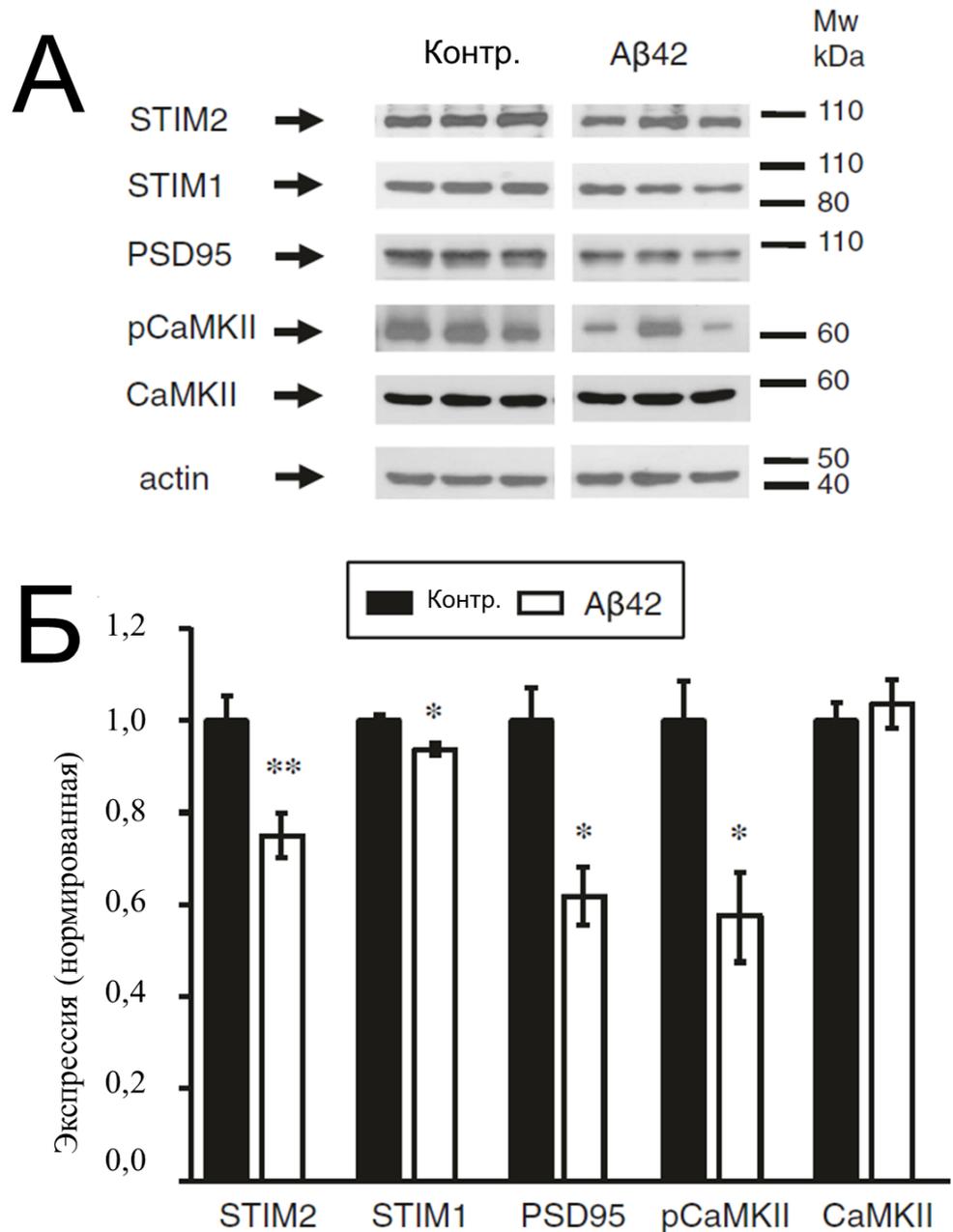


Рисунок 20 Экспрессия белков *STIM2*, *PSD95* и *pCaMKII* подавляются у мышей, которым в *CA1* область гиппокампа инъецировали *A β 42* в дозе 5,4 мг/кг. **(А)** Уровни экспрессии белков *STIM2*, *STIM1*, *PSD95*, *pCaMKII*, *CaMKII* в лизатах гиппокампа, полученных от мышей, инъецированных *A β 42* в дозе 5,4 мг/кг, и от контрольных мышей, инъецированных вторичными антителами анализировали с помощью метода Вестерн-блот. Каждая полоса на панели Вестерн-блота представляет одну мышшь. Актин был использован в качестве контроля нагрузки образцов на гель. **(Б)** Экспрессия белков *STIM2*, *STIM1*, *PSD95*, *pCaMKII* и *CaMKII* была нормализована на экспрессию актина. Значения показаны как среднее \pm стандартная ошибка среднего для контрольных мышей и мышей, которым инъецировали *A β 42*. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$ по критерию Стьюдента.

3.2.5 Гиперэкспрессия стромальной молекулы взаимодействия 2 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности *in vivo*

Для оценки потенциальных нейропротекторных эффектов гиперэкспрессии STIM2 *in vivo*, проведены стереотаксические инъекции вируса AAV1-mSTIM2 вместе с олигомерами A β 42-Alexa555 в дозе 5,4 мг/кг в область CA1 гиппокампа 2-месячных мышей линии M. Контрольным мышам вводили AAV1-mSTIM2 вместе с вторичными антителами. Морфологию дендритных шипиков в области CA1 анализировали с помощью двухфотонной микроскопии с использованием срезов головного мозга гиппокампа через шесть недель после инъекции (Рисунок 21 А). Мы обнаружили, что инъекция олигомеров A β 42 приводит к значительной потере плотности шипиков (Рисунок 21 Б) и сокращению процента грибовидных шипиков (Рисунок 21 В). Гиперэкспрессия белка STIM2 не влияла на общую плотность дендритных шипиков и на процент грибовидных шипиков в контрольных экспериментах, но приводила к полному восстановлению сниженной плотности шипиков и процента грибовидных шипиков, вызванной олигомерами A β 42 (Рисунок 21 Б, В). Для дальнейшего подтверждения полученных результатов мы провели Вестерн-блот анализ лизатов гиппокампа у этих мышей (Рисунок 22). Было выявлено, что экспрессия STIM2 предотвращает снижение уровня экспрессии белков PSD95 и pCaMKII в гиппокампальной области мышей инъекцированных A β 42 (Рисунок 22 А, Б).

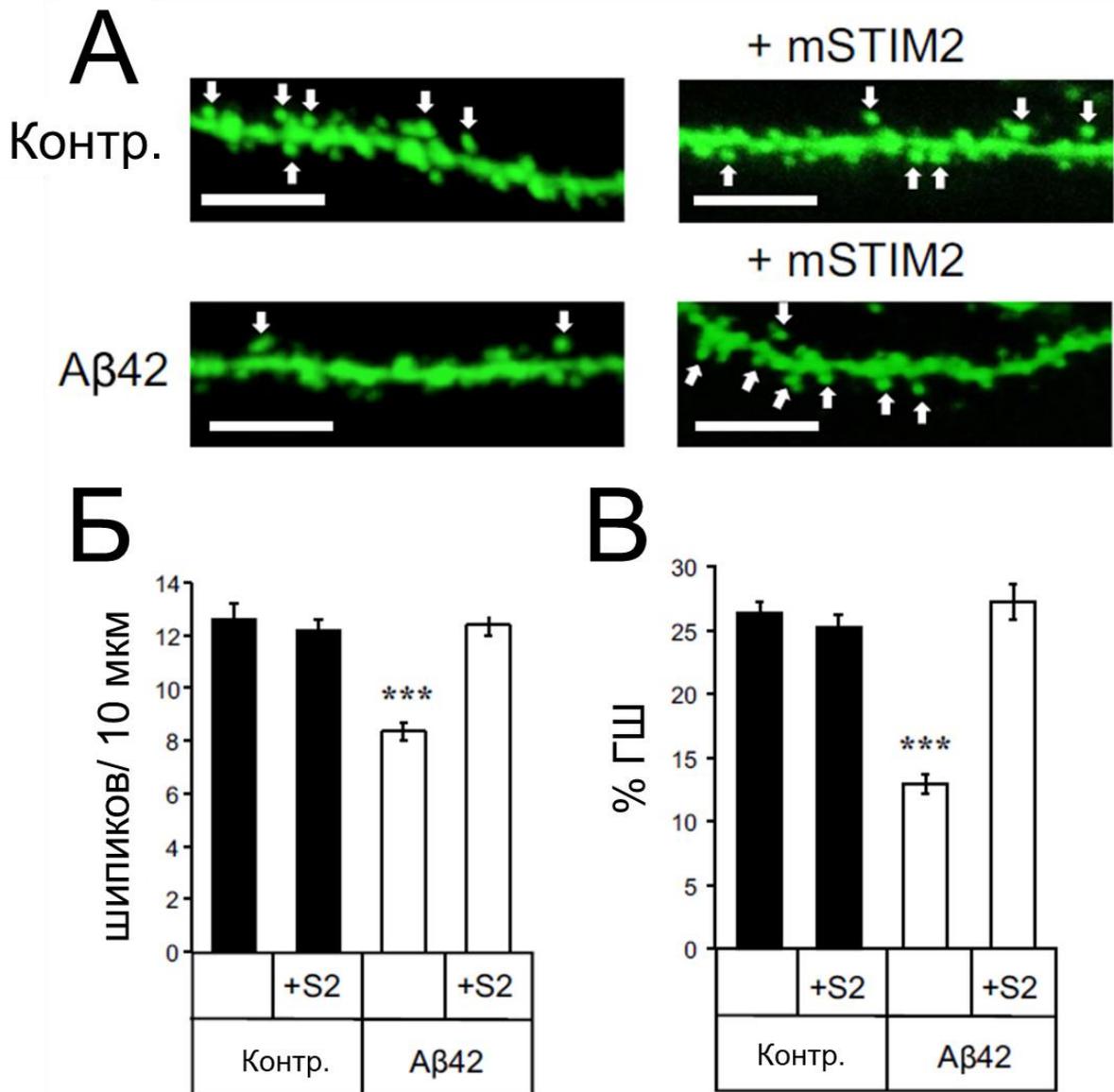


Рисунок 21 Гиперэкспрессия STIM2 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности *in vivo*. (А) Морфология дендритных шипиков в СА1 области нейронов гиппокампа у мышей линии М в возрасте 3,5 мес, которым инъецировали AAV1-mSTIM2 (+mSTIM2) в отсутствии (Контр.) / присутствии Аβ42. Аβ42 инъецировали в СА1 область гиппокампа в дозе 5,4 мг/ кг. Морфологию дендритных шипиков визуализировали на двухфотонном микроскопе. Масштабная линейка соответствует 5 мкм. Присутствие грибовидных шипиков на микрофотографиях обозначено стрелкой. (Б, В) Общая плотность шипиков и процент грибовидных шипов (ГШ) в СА1 области нейронов гиппокампа в контрольной группе нейронов (Контр.), в контрольной группе после инъекции вируса AAV1-mSTIM2 (+S2), а также в экспериментальной группе в присутствии олигомеров Аβ42 (5,4 мг/ кг) и в группе с Аβ42 (5,4 мг/ кг) после инъекции вируса AAV1-mSTIM2 (+S2). График представляет данные трех независимых экспериментов. Для количественного определения процентного содержания шипиков были

проанализированы $n = 21-30$ нейронов. Значения показаны как среднее \pm стандартная ошибка среднего. ***: $p < 0,0005$ по критерию Стьюдента.

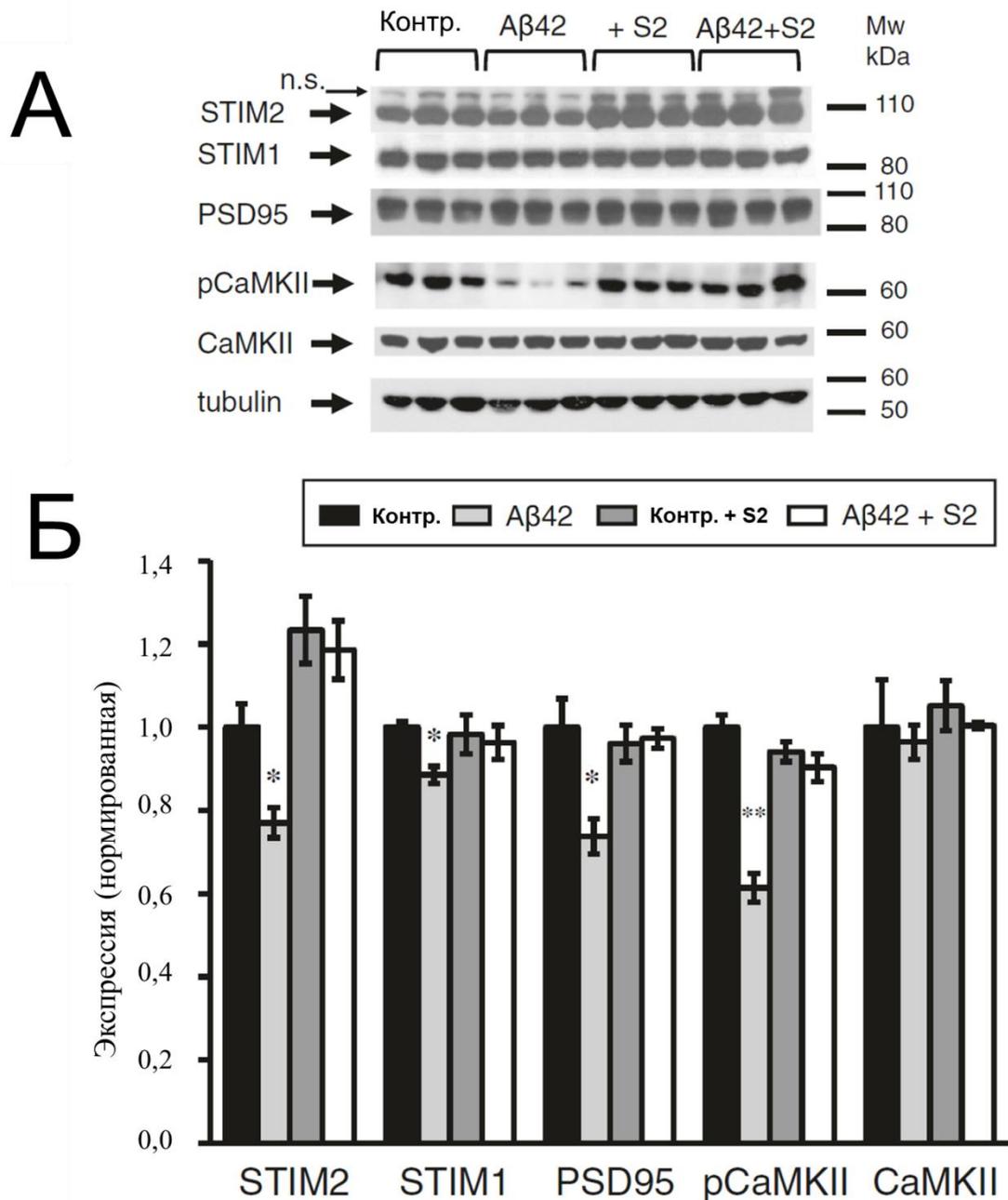


Рисунок 22 Гиперэкспрессия *STIM2* восстанавливает уровни экспрессии белков *PSD95* и *pCaMKII* в условиях амилоидной токсичности *in vivo*. (А) Вестерн-блот анализ экспрессии белков *STIM2*, *STIM1*, *PSD95*, *pCaMKII*, *CaMKII* и *tubulin* в лизатах из гиппокампов мышей контрольной группы, группы инжескированной $A\beta_{42}$ (5,4 мг/ кг), контрольной группы инжескированной AAV1-m*STIM2* (+S2), и группы инжескированной $A\beta_{42}$ (5,4 мг/ кг) совместно с AAV1-m*STIM2* ($A\beta_{42}$ +S2). Каждая полоса соответствует одной мышце. Покраска на *tubulin* использовалась как контроль равномерной нагрузки белка. (Б) Экспрессия белков *STIM2*, *STIM1*, *PSD95*, *pCaMKII*, *CaMKII*, нормированная на *tubulin* и на экспрессию в контрольной группе.

Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$ по критерию Стьюдента. n.s. (не специфично).

3.2.6 Регуляция уровня экспрессии гена стромальной молекулы взаимодействия 2 методами генетической инженерии влияет на число амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD

Мыши линии 5xFAD рассматриваются в качестве модели болезни Альцгеймера с агрессивным фенотипом, проявляющимся накоплением амилоидных бляшек и нарушением когнитивных функций мозга к 4-му месяцу жизни [192]. Для анализа уровня экспрессии эндогенной STIM2 в гиппокампе мышей линии 5xFAD использовали метод Вестерн блота. Для оценки синаптогенеза в гиппокампе трансгенных мышей исследовали экспрессию белка постсинаптической плотности 95 (PSD95). Для сравнения возрастных изменений получены данные для 4- и 6-ти месячных мышей. Контрольным экспериментом служила экспрессия исследуемых белков в лизатах гиппокампа мышей дикого типа того же возраста. Выявлено снижение экспрессии исследуемых белков у всех трансгенных мышей линии 5xFAD, но у 6-месячных мышей это снижение выражено сильнее, особенно для белка STIM2 (Рисунок 23). У 4-месячных трансгенных мышей линии 5xFAD экспрессия белка STIM2 снижена на 20% по сравнению с контрольной группой (Рисунок 23 Б). Для этой группы была также обнаружена тенденция к снижению уровня экспрессии белка PSD95 (Рисунок 23 Б). У мышей 5xFAD в возрасте 6 месяцев экспрессия белка STIM2 снижалась более чем на 75%, а экспрессия белка PSD95 на 50% (Рисунок 23 Б). Таким образом, доказано, что путь STIM2–нДУВК также нарушен в модели нБА, мышцах линии 5xFAD.

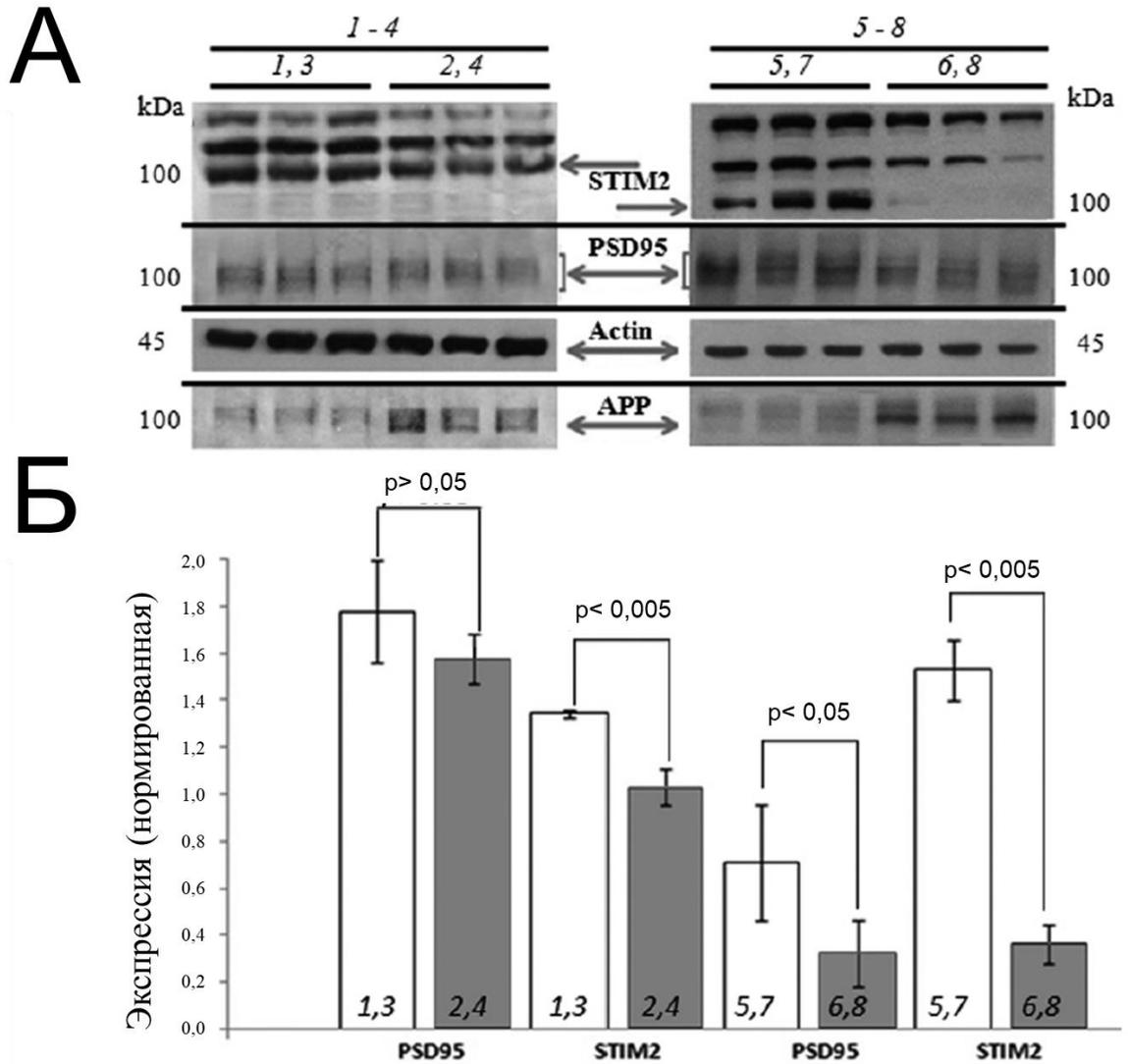


Рисунок 23 Экспериментальные данные Вестерн-блот анализа экспрессии четырех белков (STIM2, PSD95, Actin и APP) (А) и результаты их количественного анализа. Каждая полоса соответствует одной мышце. (Б). Экспрессия проанализирована в гиппокампальных лизатах 4-(номера 2,4) и 6-(6,8) месячных мышей 5×FAD и особей того же возраста из контрольной группы (1,3 и 5,7 соответственно). Буквой *p* обозначены уровни статистической значимости результатов по критерию Стьюдента.

3.2.7 Анализ количества амилоидных бляшек в головном мозге мышей линии 5xFAD

Мыши линии 5xFAD обладают сильным фенотипом, проявляющимся в нарушении когнитивных функций в возрасте 4 – 5 месяцев, при этом накопление амилоидных бляшек в головном мозге наблюдается уже на 4-м месяце [192]. Для анализа количества амилоидных бляшек в головном мозге мышей 5xFAD использовали метод иммуногистохимического

окрашивания амилоида бета ($A\beta$) с помощью амилоид-специфичных антител 6E10 (Рисунок 24 А). Иммуногистохимическое окрашивание производили в тонких срезах головного мозга мышей дикого типа (WT) и трансгенных мышей линии 5xFAD в возрасте 3,5 месяца. Из-за технических особенностей имеющегося в лаборатории молекулярной нейродегенерации (г. Санкт-Петербург, СПбПУ, зав. лаб. И.Б. Безprozванный) конфокального микроскопа отсутствовала возможность визуализировать $A\beta$ бляшки на всей поверхности коронарного среза. Поэтому было принято решение визуализировать амилоид бета в пяти различных областях коронарного среза мозга мыши (Рисунок 24 А). Оказалось, что распределение $A\beta$ бляшек на поверхности среза являлось неравномерным. В частности было обнаружено, что амилоидные бляшки в основном присутствуют в коре головного мозга и полностью отсутствуют в гиппокампе исследуемых мышей (Рисунок 24 А). В настоящей работе для количественного анализа числа $A\beta$ бляшек была выбрана кора головного мозга. Был выбран участок мозга с наибольшей плотностью амилоидных бляшек в коре головного мозга мыши линии 5xFAD. Данный участок отмечен на рисунке 24 А как С1 (кора №1). Результаты окрашивания показали, что в мышях дикого типа полностью отсутствуют амилоидные бляшки, а у мышей 5xFAD средняя площадь занимаемая амилоидными бляшками составила около 1000 μm^2 (Рисунок 24 Б).

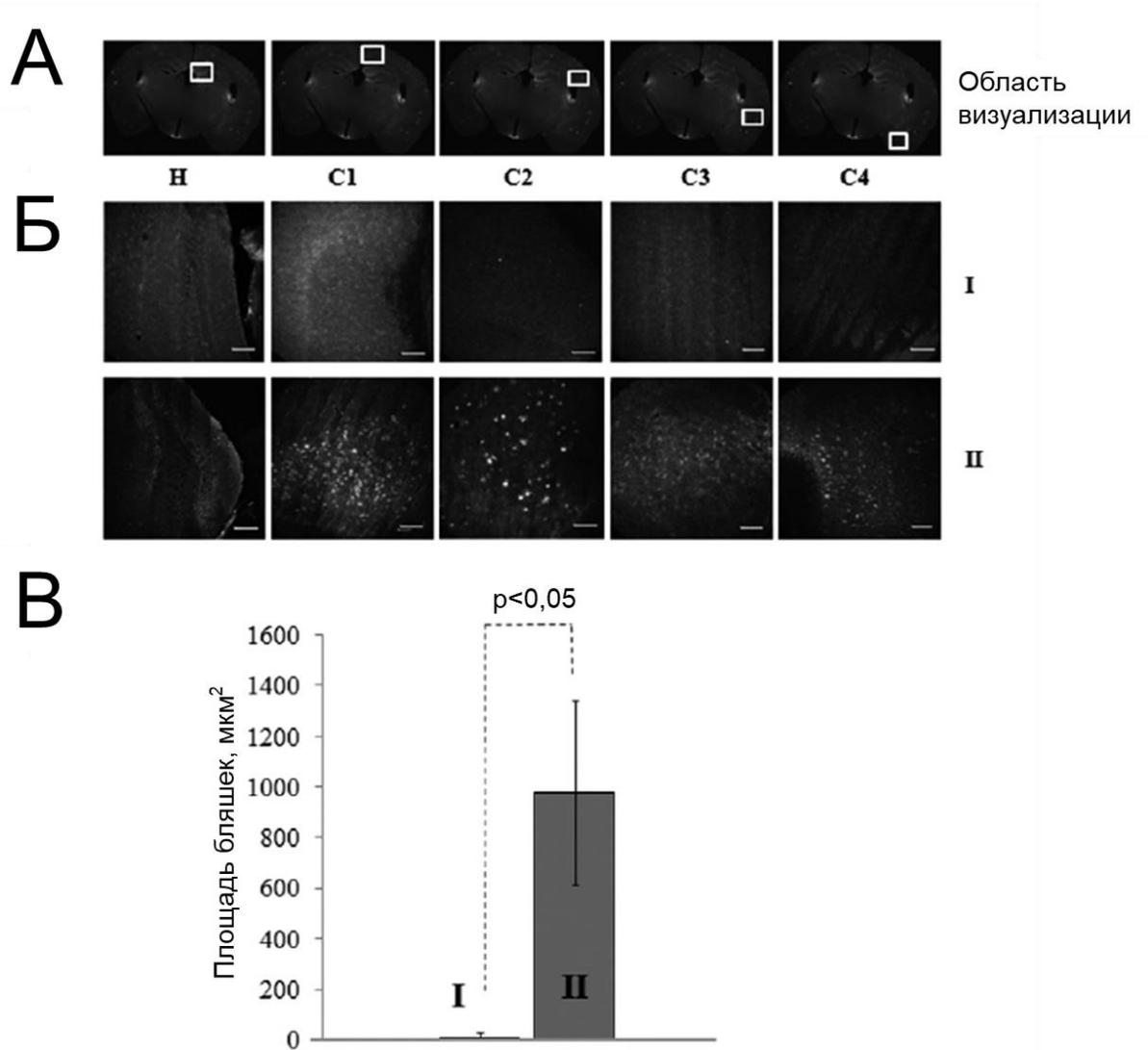


Рисунок 24 Области визуализации (А) и анализ числа Аβ-бляшек (Б, В) в корональных срезах головного мозга мышей WT (I) и 5×FAD (II) в возрасте 3,5 месяца. (А) Н – гиппокамп, С1 – С4 (кора № 1 – № 4); (Б) соответствующие тонкие срезы для мышей WT (I) и 5×FAD (II) с иммуногистохимическим окрашиванием амилоидных бляшек (масштабные отрезки соответствуют 100 мкм); (В) сравнение площадей, занимаемых бляшками на изучаемой области (С1), для мышей I и II.

3.2.8 Гиперэкспрессия белка STIM2 снижает количество амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD

Ранее в исследованиях на PS1-M146V-KI, APPKI моделях нБА, было показано, что гиперэкспрессия белка STIM2 восстанавливает путь STIM2-нДУВК [243, 288], тем самым предотвращает синаптическую потерю и замедляет развитие болезни. Для того чтобы изучить, может ли гиперэкспрессия белка STIM2 замедлить развитие БА у мышей линии 5xFAD, были

проведены эксперименты, в которых гиперэкспрессия STIM2 в гиппокампе достигалась при помощи стереотаксической инъекции вируса AAV2/1CMVSTIM2WThrGFP в область CA1 гиппокампа двухмесячных мышей. В качестве контроля использовали вирус AAV2/1CMVNLS-GFP. Через шесть недель, у мышей в возрасте 3,5 месяцев, анализировали количество амилоидных бляшек при помощи иммуногистохимического окрашивания тонких срезов мозга (Рисунок 25). Установлено, что гиперэкспрессия белка STIM2 в три раза снижает количество A β -бляшек в коре головного мозга трансгенных мышей линии 5xFAD. Таким образом, получены экспериментальные данные, демонстрирующие, что методами генетической инженерии можно влиять на содержание амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD, что косвенно указывает на перспективы регуляции активности STIM2-нДУВК для достижения терапевтического эффекта.

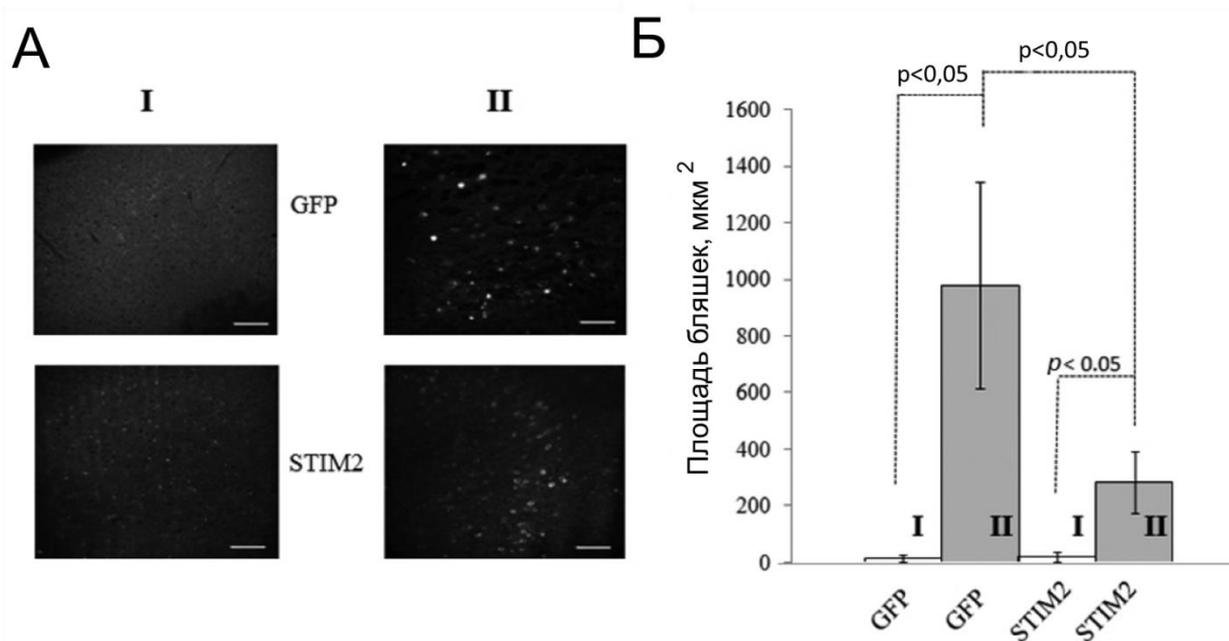


Рисунок 25 Влияние гиперэкспрессии белка STIM2 на образование амилоидных бляшек в мозге 3,5-мес. мышей (анализ количества бляшек аналогичен представленному на Рисунок 24). (А) примеры иммуногистохимического окрашивания срезов у мышей I и II, инжестированных в 2-мес. возрасте вирусами AAV2/1CMVNLS-GFP (сокращенно GFP) и AAV2/1CMVSTIM2WThrGFP (сокращенно STIM2); (Б) сравнение площадей, занимаемых бляшками на изучаемых областях, для мышей I и II.

В модели амилоидной токсичности *in vivo* были получены схожие с *in vitro* экспериментальными результатами о роли кальциевой дисрегуляции в поддержании стабильных шипиков в гиппокампе мышей. Показано, что гиперактивация нДУВК может защитить дендритные шипики от амилоидной токсичности *in vivo*.

Таким образом, разработанная модель амилоидной токсичности *in vivo* позволила обосновать фармакологическую мишень потенциальных средств патогенетической фармакотерапии БА – депо-управляемые кальциевые каналы на постсинаптических дендритных шипиках в нейронах гиппокампа.

3.3 Фармакологический анализ целесообразности коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа для лечения болезни Альцгеймера

3.3.1 Нейропротекторные свойства соединения N17 в *in vitro* модели амилоидной синаптотоксичности

Соединение N17 – бис{2- [(2E)- 4- гидроксид- 4- оксобут- 2- еноилокси]- N,N- диэтилэтанамина}бутандиоата было разработано в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете под руководством проф. С.В. Оковитого. Соединение N17 состоит из этилового производного аминокэтанола к которому присоединены молекулы бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислот. Аминокетанол, являясь прекурсором холина, обеспечивает синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран и повышает биодоступность кислот в клетку [88].

Бутандиовая кислота реализует свои эффекты через специфические рецепторы (SUCNR1) на глиальных клетках, а также повышает устойчивость нейронов к гипоксии через метаболические пути, в первую очередь, энергопродуцирующие [1]. Кроме того, бутандиовая и транс-этилен-1,2-дикарбоновая кислоты способствуют восполнению фонда сукцината и фумарата в цикле Кребса и увеличению образования АТФ в клетках. Ранее показаны антиастиенические, ноотропные и актопротекторные свойства N17.

В настоящей работе нейропротекторные свойства соединения N17 изучены в *in vitro* модели амилоидной синаптотоксичности и выявлены в концентрации 1 мкМ. Минимально действующей установлена концентрация N17 в наномолярном диапазоне – 100 нМ. Референсное соединение гиперфорин (HPF) по литературным данным [287] проявляет нейропротекторное действие в концентрации 300 нМ, которая и была применена в наших опытах.

В настоящем эксперименте первичная культура гиппокампа на седьмой день (DIV7) культивирования трансфецировалась плазмидой экспрессирующей флуоресцентный белок TD-Tomato. На DIV12-13 клетки обрабатывались синтетическими A β 42 в концентрации 100нМ или оставались не обработанными (контроль, Рисунок 26). Влияние A β 42 на формирование грибовидных шипиков анализировалось на DIV15-16. В соответствии с нашими ожиданиями и предыдущими результатами на пресенилиновой мышинной модели [243], было обнаружено, что

синтетические Аβ42 снижают процент грибовидных шипиков с $46,7 \pm 2\%$ (контроль) до $20,9 \pm 1,6\%$ (Рисунок 26 группа Аb). Также было отмечено, что Аβ42 статистически значимо сдвигает баланс от грибовидных шипиков в сторону тонких и пеньковых шипиков (Рисунок 26 В, Г). Ранее было показано, что гиперфорин способен защищать грибовидные шипики от амилоидной токсичности, путем активации нДУВК [287]. Гиперфорин добавлялся к культуре клеток за 16 часов до фиксации в концентрации 300 нМ. В соответствии с предыдущими данными показано, что НРФ восстанавливает процент грибовидных шипиков в нейронах выдержанных в присутствии Аβ42 с $20,9 \pm 1,6\%$ до уровня контроля в $49,9 \pm 1,2\%$ (Рисунок 26 Б). Кроме того, НРФ снижал процент тонких шипиков в группе с Аβ42 с 50% до уровня контроля в 30% (Рисунок 26 В). НРФ также влиял на пеньковые шипики, снижая их процент с $33,2 \pm 1,8\%$ до $20,6 \pm 1\%$ (Рисунок 26 Г). Нейропротекторные свойства N17 (бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата) изучались по аналогичной с НРФ схеме. N17 добавлялся к культуре клеток за 16 часов до фиксации в концентрации 100 нМ. Было обнаружено, что N17 обладает нейропротекторными свойствами, а именно защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности. На Рисунок 26 Б показано, что N17 восстанавливает процент грибовидных шипиков в группе с Аβ42 с $20,9 \pm 1,6\%$ до $39 \pm 1,6\%$ (процент близкий к контрольному значению). Аналогично НРФ, N17 снижает процент тонких шипиков в группе с Аβ42 до контрольного уровня (Рисунок 26 В). Также было обнаружено, что N17 снижает процент пеньковых шипиков с $33,2 \pm 1,8\%$ до $22,3 \pm 1,3\%$ в группе с Аβ42 (Рисунок 26 Г). Полученные данные свидетельствуют о том, что N17 способен защитить грибовидные шипики от амилоидной токсичности и его рабочая концентрация лежит в наномолярном диапазоне.

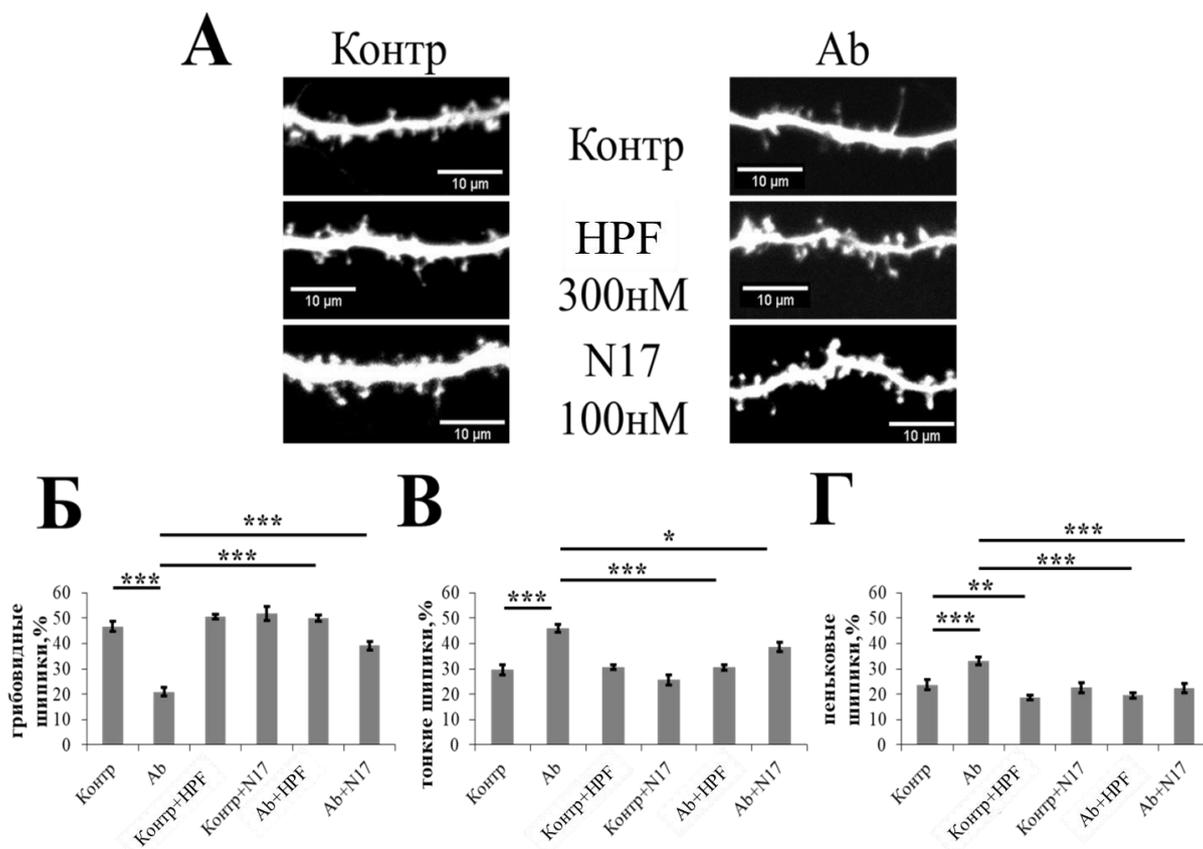


Рисунок 26 Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (N17) обладает нейропротекторными свойствами, защищая грибовидные шипики от амилоидной токсичности, в концентрации 100нМ. (А) Репрезентативные микрофотографии каждой исследованной группы гиппокампальных нейронов трансфицированных плазмидой TD-Tomato. (Б, В, Г) Количественный анализ морфологии дендритных шипиков полученный при помощи программного обеспечения NeuronStudio. Процентное содержание грибовидных (Б), тонких (В) и пеньковых (Г) шипиков в экспериментальных группах. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе n (нейронов) = 30±2. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Результат считался статистически значимым при достижении $p < 0,05$. Сокращения: Контр – контрольная группа, Ab – бета-амилоид 42, HPF – гиперфорин. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем и по сравнению с группой в присутствии 100 нМ Aβ42 (Ab). 100% соответствует сумме грибовидных, тонких и пеньковых шипиков на одном дендрите.

3.3.2 Соединение N17 активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа *in vitro*

Для анализа механизмов нейропротекторного действия соединения N17 исследовали его способность активировать нейрональный депо-управляемый вход кальция в дендритных шипиках в условиях амилоидной синаптотоксичности *in vitro*. Для сравнения эффективности с референсным соединением концентрация N17 в экспериментах по кальциевому имиджингу также составляла 300 нМ. Время инкубации нейронов с исследуемыми соединениями составляло 30 мин при комнатной температуре. Исследуемые соединения находились в растворе искусственной спинномозговой жидкости на протяжении всего эксперимента. Для оценки нДУВК в дендритных шипиках гиппокампальных нейронов использовали технологию однократной трансфекции генетической конструкции, несущей ген генетически кодируемого кальциевого индикатора. В настоящем эксперименте первичная культура гиппокампа на седьмой день (DIV7) культивирования трансфецировалась плазмидой экспрессирующей генетически-кодируемый кальциевый индикатор (GECI) GCamp5.3. На DIV12-13 клетки обрабатывались синтетическими 100 нМ A β 42 или оставались не обработанными (контроль, Рисунок 27). Влияние A β 42 на нДУВК, а также способность исследуемых соединений активировать нДУВК анализировалось на DIV15-16. На рисунке Рисунок 27 приведен сравнительный анализ изменений амплитуды нейронального депо-управляемого входа кальция (F/F₀ пик) в исследуемых группах.

Согласно полученным данным A β 42 снижал амплитуду нДУВК с $5,6 \pm 0,5$ у.е. до $3,6 \pm 0,6$ у.е. (Рисунок 27 А, Г, Ж). Референсное соединение гиперфорин – НРФ, активатор нДУВК, в концентрации 300 нМ восстанавливает амплитуду нДУВК в группе нейронов с A β 42 с $3,6 \pm 0,6$ у.е. до $6,75 \pm 0,4$ у.е. (Рисунок 27 Г, Д, Ж). Показано, что соединение N17 в концентрации 300 нМ является положительным регулятором нДУВК и восстанавливает амплитуду нДУВК в группе нейронов с A β 42 с $3,6 \pm 0,6$ у.е. до уровня контроля в $5,6 \pm 0,5$ у.е. (Рисунок 27 А, Г, Е, Ж). Важно отметить, что соединение N17 запускает нДУВК в первую очередь в дендритных шипиках т.к. интенсивность флуоресценции GCamp5.3 увеличивается сначала в дендритных шипиках, а потом в дендритах (Рисунок 28).

Таким образом, обнаружено, что соединение N17 по показателю восстановления нейронального депо-управляемого входа кальция в дендритных шипиках, подвергнутых синаптотоксическому действию амилоида имеет схожую с референсным соединением активность.

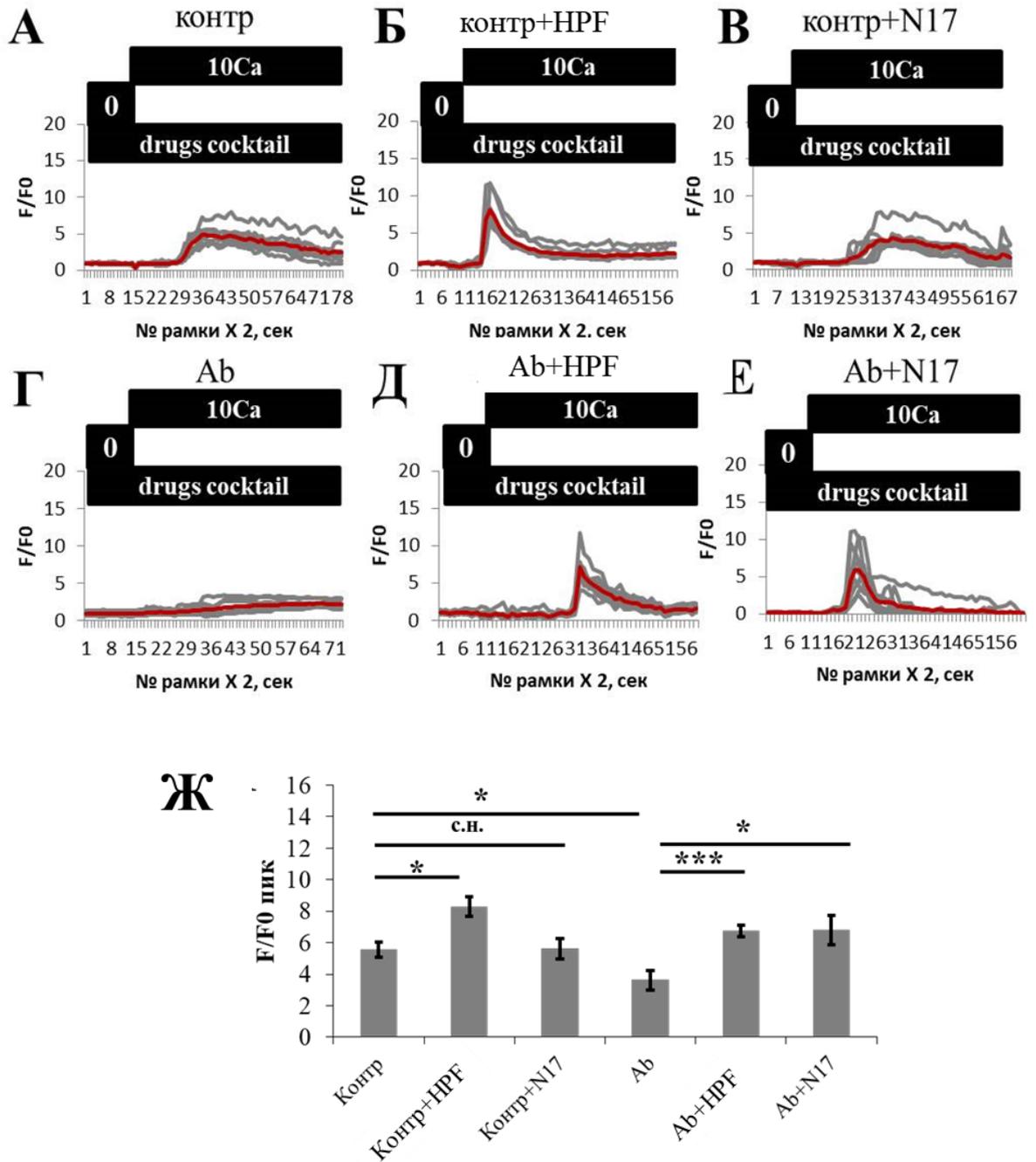


Рисунок 27 Исследование влияния соединения N17 в концентрации 300 нМ на нейрональный депо-управляемый вход кальция в условиях амилоидной синаптотоксичности. (А, Б, В, Г, Д, Е) Примеры записи нДУВК в исследуемых группах. (Ж) Сравнительный анализ изменения амплитуды нДУВК (F/F0 пик) в исследуемых группах. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано 60 ± 10 дендритных шипика. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Результат считался статистически значимым при достижении $p < 0,05$. Сокращения: Контр- контрольная группа, Ab – амилоид бета 42, HPF - гиперфорин. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$, с.н. – статистически не

значимый результат при $p > 0,05$, drugs cocktail – блокаторы кальциевых каналов, такие как D-AP5, нифедипин, CNQX, TTX, тапсигаргин, 0, 10 Ca – концентрация кальция в растворе в мМ.

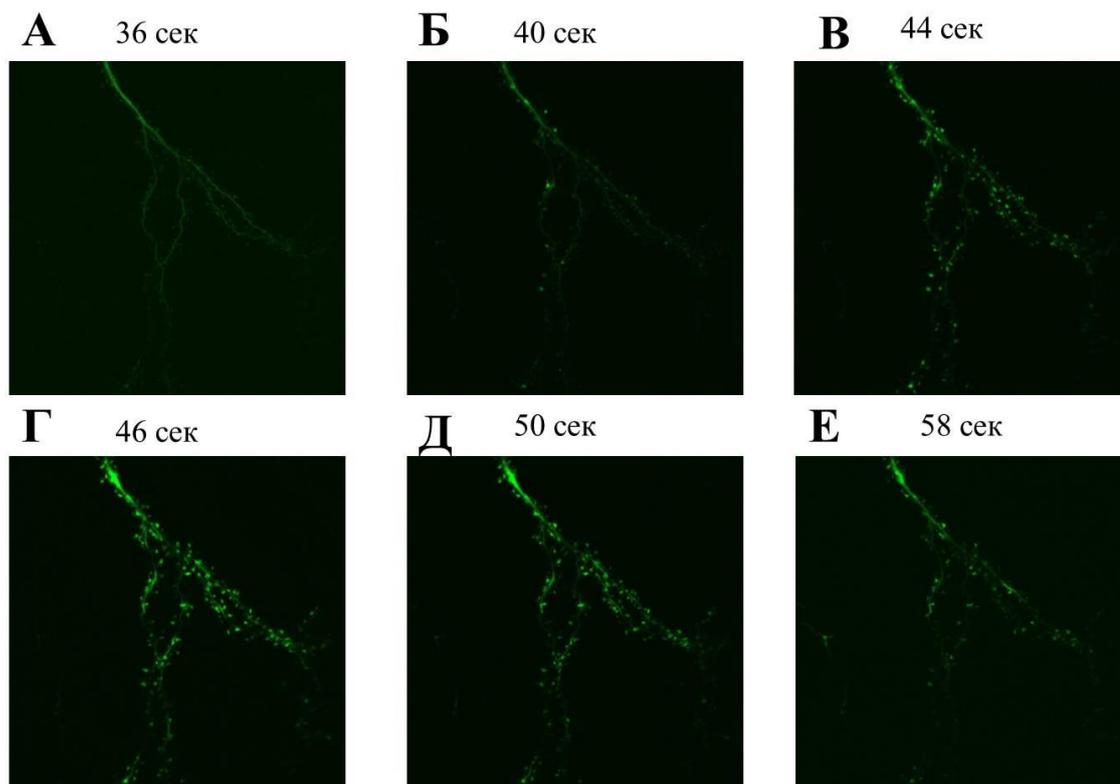


Рисунок 28 Соединение N17 запускает нейрональный депо-управляемый вход кальция в дендритных шипиках. На рисунке представлены микрофотографии записи нДУВК в гиппокампальной культуре нейронов выдержанной в присутствии 300нМ N17 в течение 30 мин при комнатной температуре. Эффект запуска нДУВК соединением N17 в дендритных шипиках очень хорошо просматривается между 40, 44 и 46 секундами записи (панели Б, В, Г).

3.3.3 Соединение N17 не активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа в отсутствие каналов TRPC6

В исследованиях лаборатории проф. И.Б. Безprozванного идентифицировали молекулярную идентичность каналов осуществляющих нейрональный ДУВК [287]. Было показано, что троичный комплекс STIM2-ORAI2-TRPC6 выполняет роль нДУВК в нейронах гиппокампа [287].

Для изучения специфичности N17 в активации TRPC6-нДУВК был использован метод выключения гена с помощью РНК-интерференции. Для этого гиппокампальная культура на DIV7 ко-трансфецировалась двумя плазмидами. Первая плазида, кодировала генетически кодируемый кальциевый индикатор GCamp5.3. Вторая плазида, несла ген, кодирующий короткую шпилечную интерферирующую РНК (shРНК), выключающую экспрессию гена

TRPC6. Кальциевый имиджинг проводился на DIV15-16. Референсным соединением был гиперфорин – HPF, известный специфичный активатор каналов TRPC6. Для сравнения эффективности с референсным соединением концентрация N17 в экспериментах по кальциевому имиджингу также составляла 300 нМ. Результаты эксперимента показаны на Рисунок 29.

Исследования показали, что выключение экспрессии гена TRPC6 приводила к значительному снижению амплитуды нДУВК с $6,0 \pm 0,6$ у.е. для контрольной группы (Рисунок 29 А, Ж) до $3,3 \pm 0,4$ у.е. для группы нейронов с выключенным геном TRPC6 (Рисунок 29 Г, Ж). Референсное соединение гиперфорин – HPF в концентрации 300 нМ не способен был восстановить амплитуду нДУВК в отсутствие гена TRPC6 до уровня контроля, хотя вызывал статистически значимое повышение амплитуды нДУВК в контрольной группе клеток с $3,3 \pm 0,4$ у.е. до $4,3 \pm 0,5$ у.е. (Рисунок 29 Г, Д, Ж). Последнее наблюдение объясняется тем, что РНК интерференция не выключает ген полностью, всегда остаются следовые количества таргетного белка, которых вероятно достаточно для того, чтобы HPF мог активировать нДУВК. Эксперименты показали, что N17 в концентрации 300 нМ не способен активировать нДУВК в отсутствие TRPC6 (Рисунок 29 А, В, Е, Ж). Таким образом, в настоящей работе получено экспериментальное подтверждение, что N17 активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция регулируемый TRPC6 каналами в первичных культурах гиппокампа в условиях амилоидной токсичности.

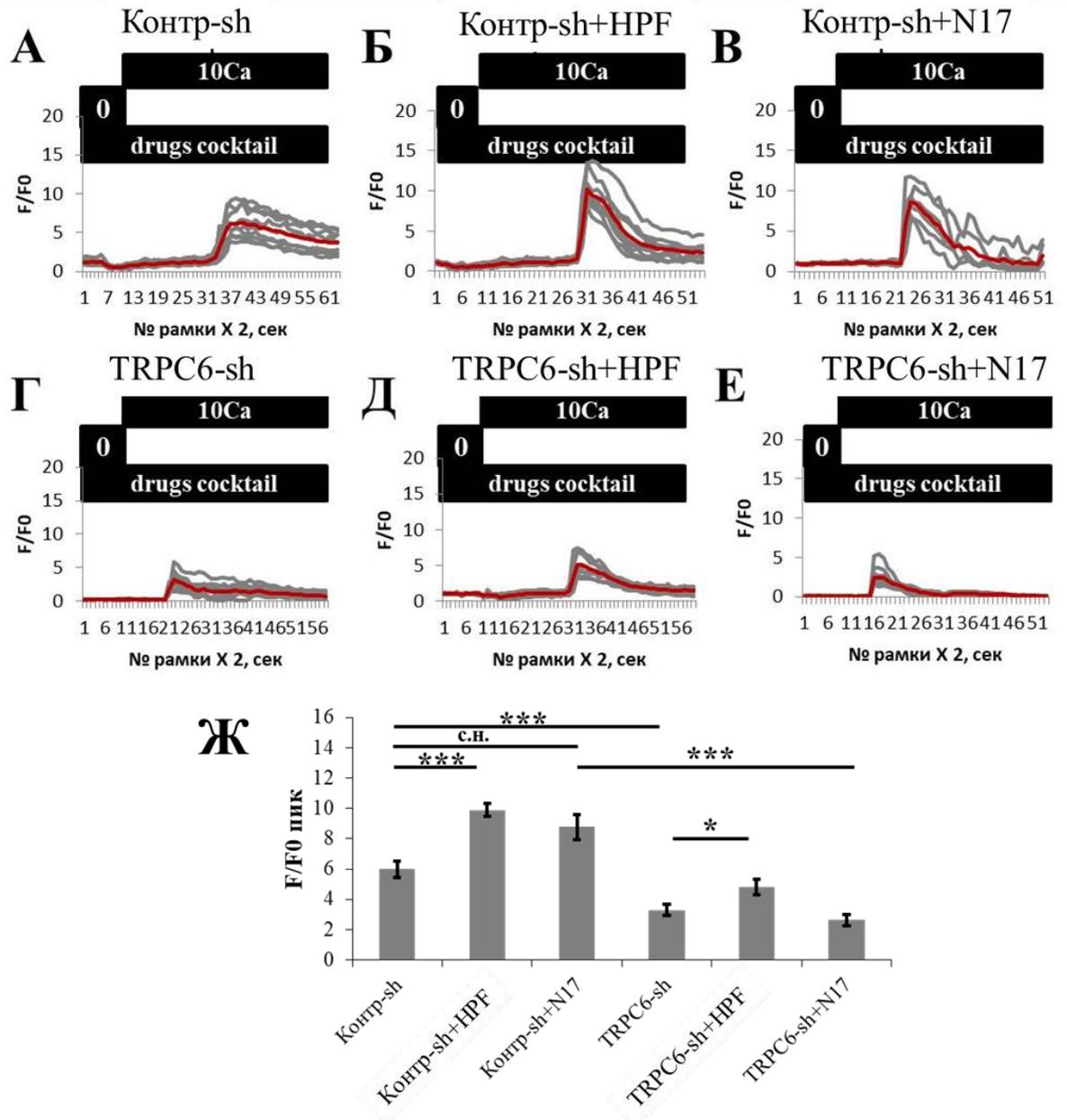


Рисунок 29 В отсутствии каналов TRPC6 соединение N17 в концентрации 300 нМ не активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция. (А, Б, В, Г, Д, Е) Примеры записи нДУВК в исследуемых группах. (Ж) Сравнительный анализ изменения амплитуды нДУВК (F/F0 пик) в исследуемых группах. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено два повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано 40 ± 10 дендритных шипика. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Результат считался статистически значимым при достижении $p < 0,05$. Сокращения: Контр-sh контрольная группа нейронов, которая была трансфицирована shРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК, TRPC6-sh - группа нейронов, трансфицированная shРНК комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6, HPF - гиперфорин, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ ***, $p < 0,0005$, с.н. – статистически не значимый результат при

$p > 0,05$, drugs cocktail – блокаторы кальциевых каналов, такие как D-AP5, нифедипин, CNQX, ТТХ, тапсигаргин, 0, 10 Ca – концентрация кальция в растворе в мМ.

3.3.4 Соединение N17 улучшает показатели краткосрочной памяти у крыс в тесте «лабиринт Барнс» при моделировании ишемии головного мозга

Результаты получены совместно с к.б.н., доцентом кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Санкт-Петербургского Государственного Химико-Фармацевтического Университета Ю.И. Сысоевым. Прекращение кровотока в течение часа по бассейну среднемозговой артерии приводит к ухудшению показателей краткосрочной и долгосрочной памяти у крыс [3]. На следующий день после ишемии наблюдалось достоверное увеличение времени нахождения животными targetbox, а также повышение количества ошибок по сравнению с контролем на 1-й и 7-й день, соответственно (Рисунок 30 и Рисунок 31). N17 вводили в дозе 10 мг/ кг, в/бр., выбранной на основании ранее полученных данных [4]. N17 вводили через 1 ч после реперфузии и далее в течение 7 дней в одно и то же время. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентных количествах (1 мл/200г массы). Установлено, что N17 в первые сутки после окклюзии среднемозговой артерии достоверно снижает ($p = 0,0023$) количество ошибок при нахождении targetbox (Рисунок 30), что свидетельствует об улучшении кратковременной памяти подопытных животных.

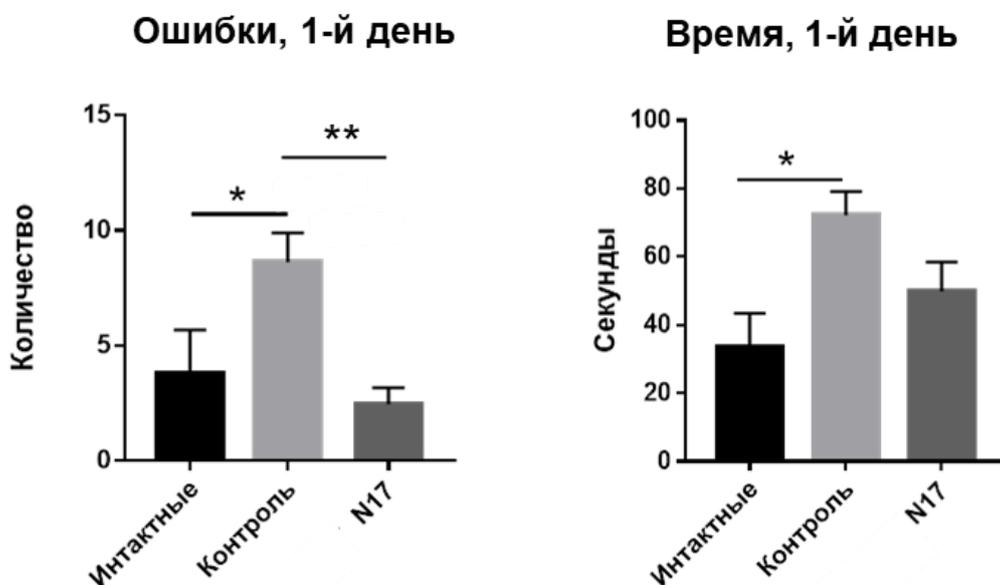


Рисунок 30 Количество ошибок и время нахождения targetbox животными на 5-е сутки эксперимента (1-й день после ишемии), характеризующие кратковременную память.

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ по результатам однофакторного анализа ANOVA с пост хок тестом Тьюки.

На 7-й день после ишемии в группе животных, которые получали N17, зарегистрирована лишь тенденция к уменьшению ошибок и времени нахождения targetbox в тесте «лабиринт Барнс» (Рисунок 31).

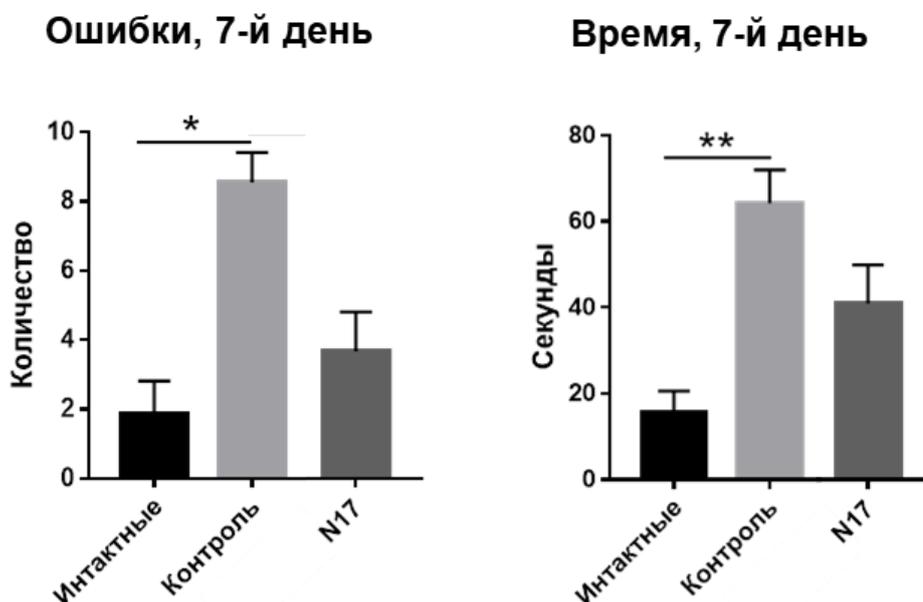


Рисунок 31 Количество ошибок и время нахождения targetbox животными на 12-е сутки эксперимента (7-й день после ишемии), характеризующие долговременную память. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ по результатам однофакторного анализа ANOVA с пост хок тестом Тьюки.

Кроме того, статистически значимых различий в проценте животных, нашедших targetbox, в дни тестирования между группами интактных и контрольных животных обнаружить не удалось (Таблица 2).

Таблица 2 Количество выживших животных от общего числа, а также количество нашедших targetbox от числа выживших на 1-й и 7-й день после ишемии

Группа	1-й после ишемии		7-й после ишемии	
	выжившие	нашедшие targetbox	выжившие	нашедшие targetbox
Интактные	10/10	8/10	10/10	9/10
Контроль	11/13	6/11	9/13	7/9
N17	15/18	10/15	12/18	10/12

3.4 Поиск и анализ нейропротекторной активности фармакологически активных химических соединений - модуляторов нейронального депо-управляемого входа кальция

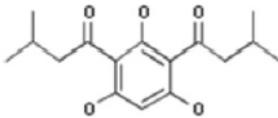
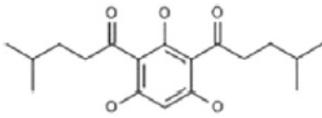
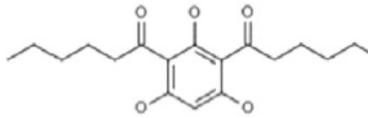
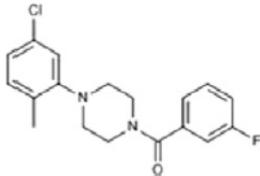
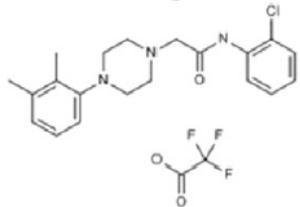
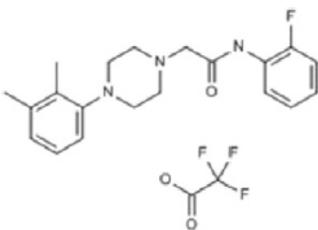
Ранее идентифицирована молекула - положительный модулятор активности каналов TRPC6 в составе нейронального депо-управляемого входа кальция в гиппокампе мышей. Данное соединение, N-{4-[2-(6-аминохиназолин-4-иламино)этил]фенил}ацетамид (NSN21778), восстанавливало грибовидные дендритные шипики и долговременную потенциацию в срезах мозга трансгенных мышей линий PS1-M146V-KI и APP-KI [287], однако оказалось фармакокинетически непригодным [287].

Поэтому в настоящем исследовании была поставлена задача поиска положительных модуляторов каналов TRPC6, отличных по химической структуре от описанных в литературе агонистов каналов TRPC6 (NSN21778, гиперфорин, PPZ1/ PPZ2). На первом этапе использованы базы данных химических соединений и методы биоинформатики. Далее фармакологический анализ нейропротекторной активности проведен на основе методов молекулярной биологии и электрофизиологии в срезах мозга трансгенных мышей.

3.4.1 Биоинформатический поиск активаторов каналов TRPC6

Из базы данных Intergrity (Clarivate Analytics) отобрано шесть потенциальных активаторов каналов TRPC6 (Таблица 3).

Таблица 3 Список агонистов каналов TRPC6 по данным базы данных Integrity (Clarivate Analytics).

Integrity ID	IUPAC Name	Structural Formula	Molecular Mechanism	Therapeutic Group
HYP-1	2,4-Bis(3-methylbutyryl)phloroglucinol 2,4-bis(3-methylbutyryl)-1,3,5-trihydroxybenzene		1) TRPC6 agonists; 2) leukotriene CysLT1 (LTD4) antagonists; 3) antagonists free fatty acid receptor 1 (FFAR1; PR40); 4) agonists signal transduction modulators; 5) prostanoid thromboxane receptors antagonists; and 6) leukotriene antagonists	1) Antiallergy/antiasthmatic drugs; 2) antiviral; and 3) agents for type 2 diabetes
HYP-5	1,1'-(2,4,6-Trihydroxybenzene-1,3-diyl)bis(4-methylpentan-1-one)		1) TRPC6 Agonists	1) Treatment of cognition disorders
HYP-9	1,1'-(2,4,6-Trihydroxybenzene-1,3-diyl)dihexan-1-one		1) TRPC6 Agonists	1) Treatment of cognition disorders
830288	[4-(5-Chloro-2-methylphenyl)piperazin-1-yl](3-fluorophenyl)methanone		1) TRPC6 Agonists	1) Psychiatric disorders (not specified); and 2) treatment of neurodegenerative diseases
871099	N-(2-Chlorophenyl)-2-[4-(2,3-dimethylphenyl)piperazin-1-yl]acetamide trifluoroacetate		1) TRPC6 agonists; and 2) TRPC3 agonists	1) Psychiatric disorders (not specified); and 2) treatment of neurodegenerative diseases
880395	2-[4-(2,3-Dimethylphenyl)piperazin-1-yl]-N-(2-fluorophenyl)acetamide trifluoroacetate		1) TRPC6 agonists; and 2) TRPC3 agonists	1) Psychiatric disorders (not specified); and 2) treatment of neurodegenerative diseases

ID, identification; IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry.

Поскольку большинство этих молекул, кроме НУР-9, оказались недоступными для экспериментального тестирования поиск соединений по химическим структурам выполнен в публичных химических библиотеках. В химической библиотеке InterBioScreen (г. Черноголовка) выявлено несколько аналогов и, исходя из высокого процента (88% и более) совпадений со структурами известных агонистов каналов TRPC6, отобрано четыре соединения-кандидата, которые приведены на рисунке 32.

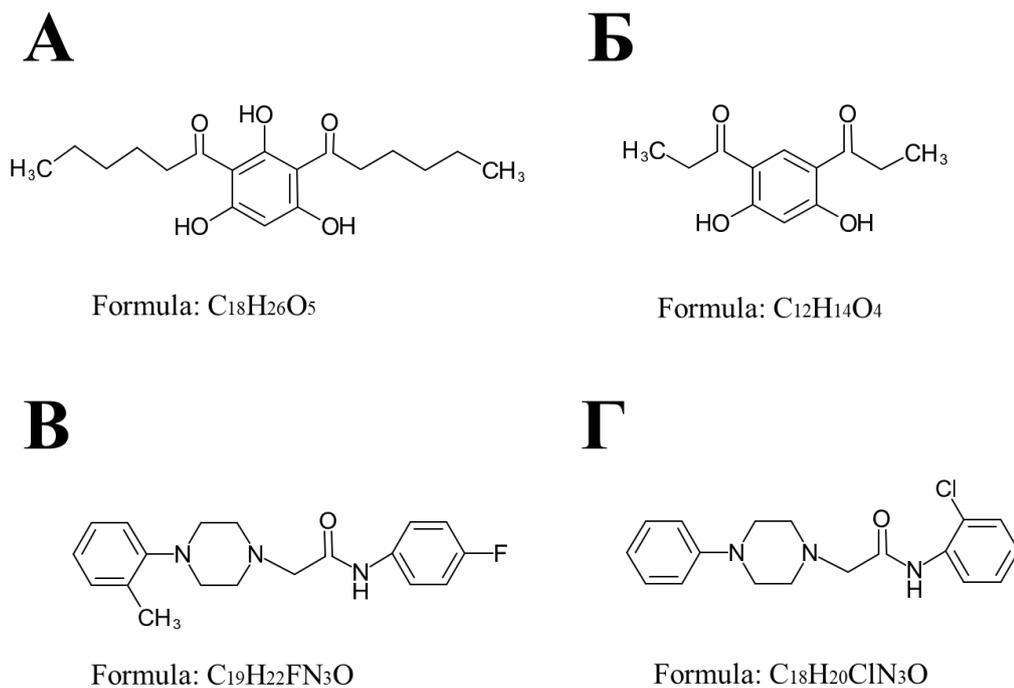


Рисунок 32 Химические структуры потенциальных положительных модуляторов каналов TRPC6 обнаруженные с помощью методов биоинформатики. (А) НУР-9 (1,1'-(2,4,6-Trihydroxybenzene-1,3-diyl)dihexan-1-one), (Б) соединение 64402 (1,1'-(4,6-dihydroxy-1,3-phenylene)bis(propan-1-one)), (В) соединение 50741 (N-(4-fluorophenyl)-2-(4-(o-tolyl)piperazin-1-yl)acetamide), и (Г) соединение 51164 (N-(2-chlorophenyl)-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide). Соединения 64402, 50741, и 51164 были найдены в химической библиотеке InterBioScreen, г.Черноголовка, Россия.

Используя биоинформатическую программу PASS, мы оценили биологическую активность, токсичность и мутагенность НУР-9 и трех соединений из базы данных InterBioScreen (соединения 64402, 50741 и 51164). Все четыре соединения показали способность активировать потенциал чувствительные кальциевые каналы со значениями P_a в диапазоне от 0,49 до 0,624, с максимальным значением для соединения 51164 и минимальным для соединения 50741. По

программе PASS предположена также другая биологическая активность – активатор кальциевых каналов с вероятностью в диапазоне от 0,22 до 0,368 и максимальным значением для соединения 51164, а минимальным - для Нур9 . Программное обеспечение PASS Online позволяет оценить возможные побочные и токсические эффекты изучаемых соединений. Для соединений 50741 и 51164 не прогнозируется негативное воздействие на сердечно-сосудистую, дыхательную системы, канцерогенность, значения P_a вблизи 0,2. Однако для соединения 51164 предсказывается возможность желудочно-кишечных геморрагических повреждений, полиорганной недостаточности со значениями P_a в диапазоне от 0,56 до 0,78. Соединение 50741 обладает, согласно прогнозам, умеренными побочными действиями, демонстрируя $P_a = 0,38$ для желудочно-кишечного кровотечения и $P_a = 0,39$ для полиорганной недостаточности. Для соединений Нур9 и 64402 предсказывается умеренная канцерогенность и кардиодепрессивная активность со значениями P_a в диапазоне от 0,30 до 0,49. Кроме того, соединения Нур9 и 64402 демонстрируют выраженные токсические эффекты, такие как желудочно-кишечные кровотечения и полиорганная недостаточность со значениями P_a в диапазоне от 0,60 до 0,88 (Таблица 4 и 5).

Таблица 4 Механизм действия соединений – положительных модуляторов каналов TRPC6 прогнозируемый веб-сервисом PASS Online.

Mechanism of Action	Compound Number							
	Нур9		64402		50741		51164	
Structure identity (%)	100	100	91.82	91.82	90.24	90.24	88.12	88.12
Analog	Нур9	Нур9	Нур9	Нур9	880395	880395	871099	871099
Activity	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
Calcium channel (voltage-sensitive) activator	0.540	0.052	0.546	0.048	0.494	0.083	0.624	0.017
Neuropeptide Y2 antagonist	0.229	0.159	0.217	0.177	0.571	0.008	0.629	0.004
Sigma receptor agonist	0.157	0.146	0.198	0.135	0.288	0.082	0.484	0.028
Calcium channel activator	0.224	0.104	0.291	0.038	0.338	0.026	0.368	0.018
Acetylcholine neuromuscular blocking agent	—	—	0.599	0.023	0.484	0.084	0.481	0.087

—, no data available.

Таблица 5 Побочные и токсические эффекты соединений – положительных модуляторов каналов TRPC6 прогнозируемые веб-сервисом PASS Online.

Adverse and Toxic Effect	Compound Number							
	Нур9		64402		50741		51164	
Activity	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
Gastrointestinal hemorrhage	0.695	0.026	0.714	0.021	0.389	0.157	0.615	0.050
Multiple organ failure	0.600	0.060	0.677	0.037	0.394	0.156	0.762	0.018
Toxic vascular/respiration	0.798v	0.018v	0.885r	0.019r	0.096v	0.403v	0.254v	0.241v
Carcinogenic. group 1	0.306	0.055	0.357	0.033	0.115	0.401	0.200	0.161
Cardiodepressant	0.491	0.021	0.455	0.026	0.044	0.342	0.196	0.145
Carcinogenic. group 2A	0.155	0.099	0.198	0.064	0.057	0.242	0.169	0.087

r, respiration; v, vascular.

3.4.2 Скрининговые исследования *in vitro* фармакологической активности соединений – потенциальных агонистов каналов TRPC6

В настоящем разделе для исследования использовали *in vitro* модель амилоидной синаптотоксичности, на которой проверяли нейропротекторные свойства соединений, выбранных с помощью методов биоинформатики (Рисунок 32). В качестве положительного контроля был использован HPF, поскольку ранее показано, что HPF в концентрации 30нМ защищает грибовидные шипики в мышинной модели БА, APP-KI нейронах [287] и является прямым активатором каналов TRPC6 [156]. В концентрации 100нМ соединение НУР9 демонстрировало тенденцию в защите грибовидных шипиков (ГШ) от амилоидной токсичности, однако уровень статистической значимости достигнут не был [%ГШ в группе Аβ42 было 10% ±4% по сравнению с %ГШ в группе Аβ42+100нМ НУР9 (14% ±3%), $p > 0,05$ по однофакторному ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Dunn-Sidak, $n = 16$ нейронов из двух независимых культур (Рисунок 33). В концентрации 1 мкМ НУР9 также не защищал грибовидные шипики от амилоидной токсичности в наших экспериментах [%ГШ в группе Аβ42 составлял 10% ± 4% по сравнению с %ГШ в группе Аβ42 + 1мкМ НУР9 (10%±6%), $p > 0,05$ по однофакторному ANOVA с последующим тестом по Dunn-Sidak, $n = 16$ нейронов из двух независимых культур (Рисунок 33).

Далее мы исследовали соединение 64402, которое имеет самый высокий процент сходства (91%) со структурой НУР-1 (известный из литературных данных активатор TRPC6) [155] (Таблица 4). Мы обнаружили, что соединение 64402 не демонстрирует нейропротекторные свойства даже при концентрации 1 мкМ [%ГШ в группе Аβ42 составил 10% ± 4% по сравнению с %ГШ в группе Аβ42 + 1мкМ 64402 9% ± 5%), $p > 0,05$ по одностороннему ANOVA с последующим тестом по Dunn-Sidak, $n = 16$ нейронов из двух независимых культур (Рисунок 33).

Таким образом, в условиях амилоидной токсичности установлено, что соединения НУР9 и 64402 не восстанавливают процент грибовидных шипиков (Рисунок 33).

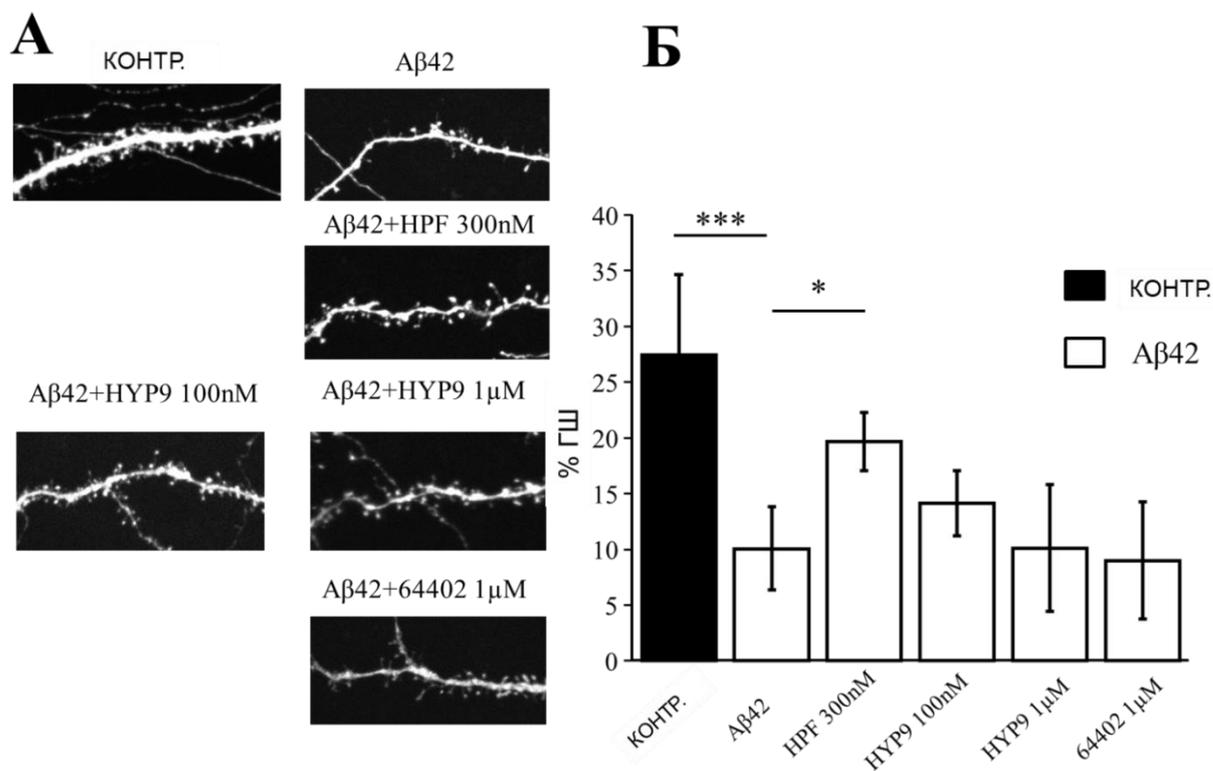


Рисунок 33 Оценка нейропротекторных свойств HYP9 и соединения 64402 в условиях амилоидной синаптотоксичности. (А) Репрезентативные микрофотографии дендритных шипиков на 14-й день культивирования нейронов гиппокампа *in vitro*, трансфицированных плазмидой TD-Tomato, для разных экспериментальных групп. Приведены репрезентативные микрофотографии для контрольных (КОНТР.) культур и культур, подвергнутых воздействию олигомерного Aβ42. HPF (гиперфорин) добавляли в концентрации 300 нМ, HYP9 тестировали в концентрациях 100 нМ и 1 мкМ, как указано, соединение 64402 тестировали при концентрации 1 мкМ. (Б) Средний процент грибовидных шипиков (% ГШ) в каждой экспериментальной группе представлен как среднее значение ± стандартное отклонение ($n \geq 16$ нейронов для каждой группы). Контрольные культуры гиппокампа (КОНТР.) показаны в виде черного столбца. Белые столбцы соответствуют культурам гиппокампа, которые были обработаны олигомерным Aβ42. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$ по однофакторному анализу ANOVA, с процедурой множественных сравнений по тесту Dunn-Sidak.

Среди отобранных программой PASS соединений оказались производные пиперазина (50741 и 51164), демонстрирующие нейропротекторные свойства в *in vitro* модели амилоидной синаптотоксичности. Соединение 50741 показывает высокий процент сходства (90,24%) с известным соединением-активатором каналов TRPC6 - 880395 из базы данных Integrity (Clarivate Analytics) (Таблица 3 и 4). Мы обнаружили, что соединение 50741 демонстрирует

нейропротекторные свойства в концентрации 10 и 30 нМ, восстанавливая процент грибовидных шипиков в группе нейронов, обработанных Аβ42 с 21% ± 10% до 37% ± 2% и 47% ± 2% соответственно ($p < 0,0001$ по двухфакторному ANOVA с последующим тестом по Dunn-Sidak, $n = 46$ из трех независимых культур) (Рисунок 34 А, Б). Снижение концентрации соединения 50741 до 1 нМ вело к потере защитного действия от токсичности Аβ42 [%ГШ в группе Аβ42 + 1нМ 50741 составлял 22% ± 2%, $n = 46$ нейронов] (Рисунок 34 А, Б). Соединение 51164 показывает сходство в 88% с химической структурой соединения 871099 из Integrity (Clarivate Analytics) (Таблица 3 и 4). Соединение 51164 также в концентрациях от 10 нМ до 30 нМ восстанавливало процент грибовидных шипиков в условиях амилоидной токсичности *in vitro* (Рисунок 35). Процент грибовидных шипиков, восстановленный после добавления 51164 в концентрации 10 нМ, составил 49% ± 1% в группе Аβ42 + 10нМ 51164, $n = 46$ нейронов, что на 12% выше, чем в группе Аβ42 + 10 нМ 50741. В низкой концентрации 1 нМ соединение 51164 не проявляло нейропротекторных свойств [%ГШ в группе Аβ42 + 1нМ 51164 составлял 23% ± 2%, $n = 46$ нейронов] (Рисунок 35).

Сравнение нейропротекторных влияний соединений 50741 и 51164 привело к заключению, что эффект соединения 51164 более выражен, что определило выбор его в качестве лидера для дальнейших исследований (Рисунок 35). Кроме того, соединение 51164 демонстрировало умеренные токсические свойства в биоинформатической программе PASS (Таблица 5).

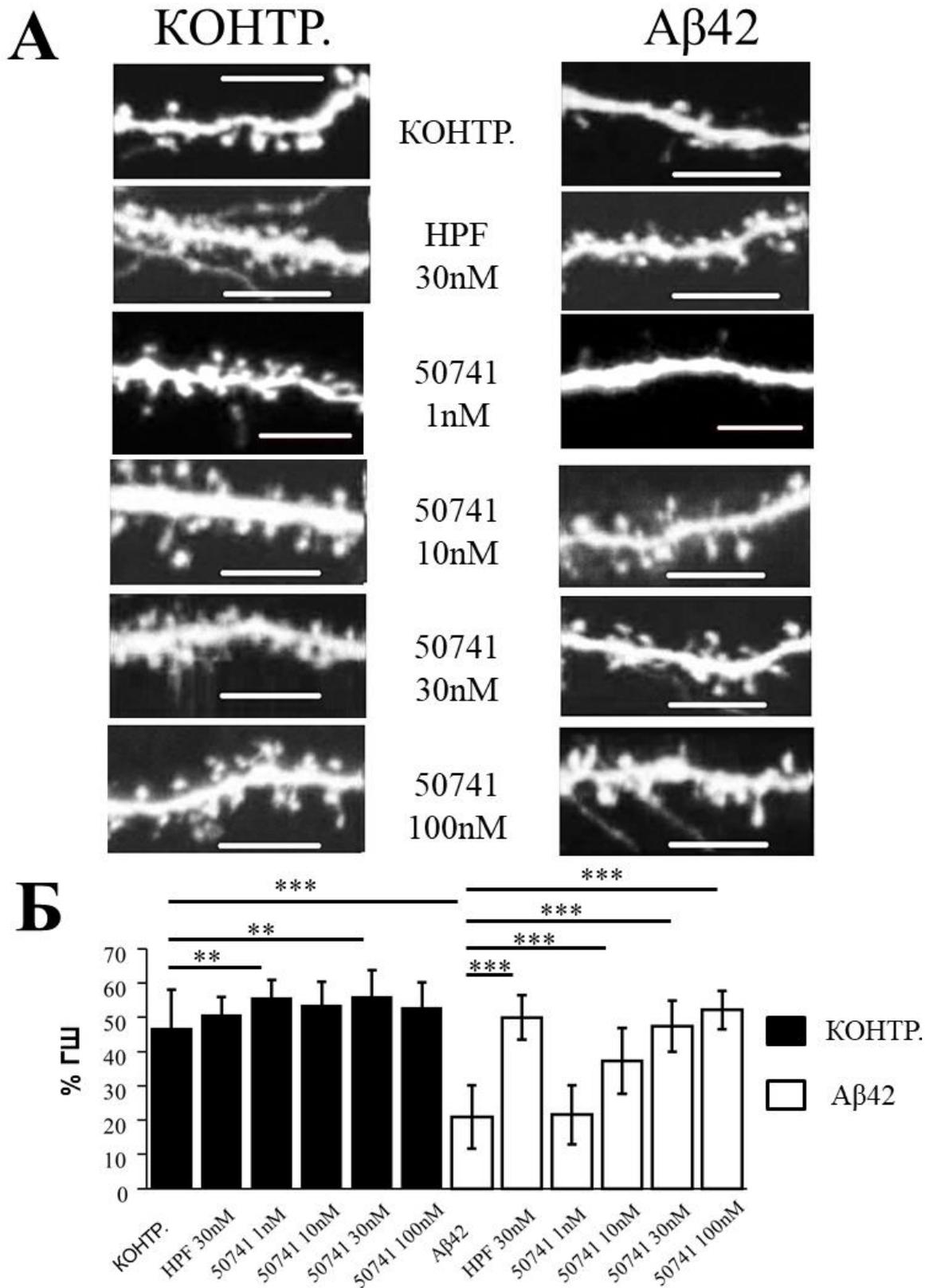


Рисунок 34 Оценка нейропротекторных свойств соединения **50741** в условиях амилоидной синаптотоксичности. (А) Репрезентативные микрофотографии дендритных шипиков на 14-й день культивирования нейронов гиппокампа *in vitro*, трансфицированных

плазмидой TD-Tomato, для разных экспериментальных групп. Приведены репрезентативные микрофотографии для контрольных (КОНТР.) культур и культур, подвергнутых воздействию олигомерного A β 42. HPF (гиперфорин) добавляли в концентрации 30 нМ, соединение 50741 тестировали в концентрациях 1, 10, 30 и 100 нМ, как указано. Масштабная линейка соответствует 10 мкм. **(Б)** Средний процент грибовидных шипиков (% ГШ) в каждой экспериментальной группе представлен как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 22-32$ нейронов для каждой группы). Контрольные культуры гиппокампа (КОНТР.) показаны в виде черного столбца. Белые столбцы соответствуют культурам гиппокампа, которые были обработаны олигомерным A β 42. ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по двухфакторному анализу ANOVA, с процедурой множественных сравнений по тесту Dunn-Sidak.

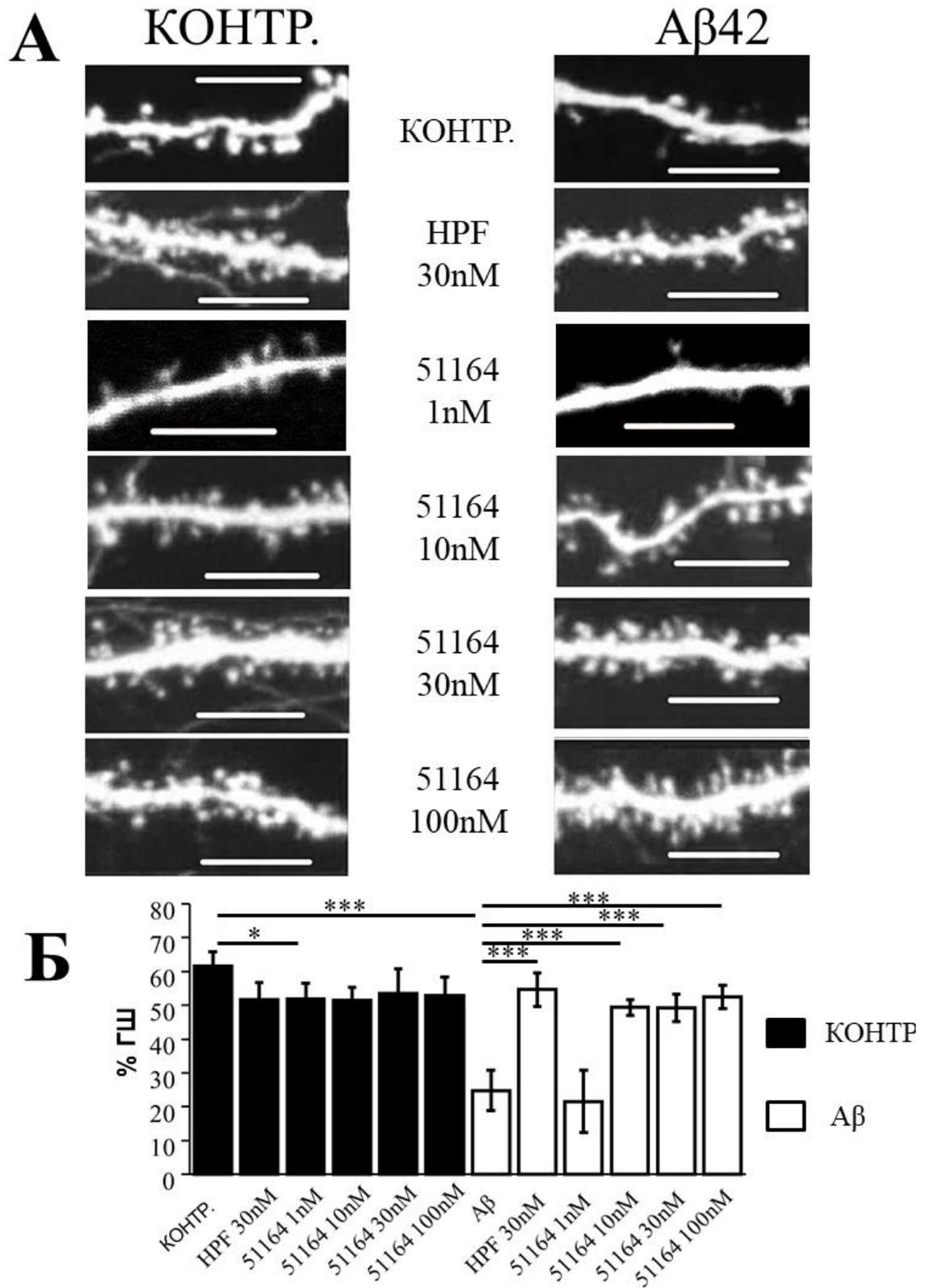


Рисунок 35 Оценка нейропротекторных свойств соединения **51164** в условиях амилоидной синаптотоксичности. (А) Репрезентативные микрофотографии дендритных шипиков на 14-й день культивирования нейронов гиппокампа *in vitro*, трансфицированных плазмидой TD-Tomato, для разных экспериментальных групп. Приведены репрезентативные

микрофотографии для контрольных (КОНТР.) культур и культур, подвергнутых воздействию олигомерного Аβ42. HPF (гиперфорин) добавляли в концентрации 30 нМ, соединение 51164 тестировали в концентрациях 1, 10, 30 и 100 нМ, как указано. Масштабная линейка соответствует 10 мкм. **(Б)** Средний процент грибовидных шипиков (% ГШ) в каждой экспериментальной группе представлен как среднее значение ± стандартное отклонение (n = 22-32 нейронов для каждой группы). Контрольные культуры гиппокампа (КОНТР.) показаны в виде черного столбца. Белые столбцы соответствуют культурам гиппокампа, которые были обработаны олигомерным Аβ42. **p < 0,005; ***p < 0,0005 по двухфакторному анализу ANOVA, с процедурой множественных сравнений по тесту Dunn-Sidak.

3.4.3 Исследование каналов TRPC6 в качестве фармакологической мишени соединения 51164

Соединение 51164 является аналогом известного активатора TRPC6 канала - производного пиперазина (PPZ) - 871099 [224]. Исходя из этих данных, необходимо было исследовать, является ли соединение 51164 активатором каналов TRPC6. Выделяют два основных механизма активации каналов TRPC. Первый механизм – рецептор зависимый – включает в себя активацию TRPC6 вторичным посредником, диацилглицеролом (DAG), который образуется в результате активации фосфолипазы С G-белком. Данный механизм считается независимым от внутриклеточных запасов кальция, в частности от концентрации кальция в ЭПР [115]. В литературе показано, что соединения 871099 и гиперфорин активируют каналы TRPC6 по рецептор-зависимому пути [156, 224]. Поэтому выполнено исследование возможного сходства эффекта соединения 51164 с 871099 и гиперфоринном.

Для этого использовали клетки линии НЕК, которые трансфецировали EGFP или TRPC6-экспрессирующими плазмидами. Чтобы оценить влияние соединения 51164 на вход кальция через каналы TRPC6 выполнили серию экспериментов по записи кальциевых ответов клеток НЕК покрашенных логотметрическим красителем Fura-2AM. Гиперфорин (HPF) был использован в качестве референсного соединения в этих экспериментах. В стандартных условиях записи кальциевых ответов (присутствие 2мМ внеклеточного Ca²⁺) добавление 10мкМ HPF запускало быстрый и сильный ответ в НЕК клетках экспрессирующих TRPC6 (НЕК-TRPC6) [пиковая амплитуда для HPF-опосредованного кальциевого ответа в НЕК-TRPC6 клетках составляла 1,0 ± 0,2 у.е. (n = 40)] (Рисунок 36 А, Б). Однако, даже в концентрации 30 мкМ соединение 51164 не вызывало кальциевого ответа в клеточной линии НЕК экспрессирующей TRPC6 в стандартных условиях записи (присутствие 2мМ внеклеточного Ca²⁺) (Рисунок 36 А, Б). Таким образом, мы

сделали вывод о том, что механизм действия соединения 51164 отличается от механизма действия HPF.

Существует другой путь активации каналов TRPC6, через опустошение внутриклеточных запасов кальция, когда инозитол 1,4,5-трифосфат (InsP3) или какой-либо другой сигнальный каскад стимулирует выброс Ca^{2+} из внутриклеточного депо ЭПР [71]. Также известны положительные модуляторы каналов TRPC6. Так, соединение NSN21778, положительный модулятор TRPC6, активирует TRPC6 в условиях опустошения депо ЭПР и в присутствии вещества OAG - проникающего через мембрану синтетического аналога клеточного DAG [78, 287]. Поэтому выполнено исследование возможного сходства эффекта соединения 51164 с NSN21778. С этой целью клетки HEK293, трансфицированные плазмидами, экспрессирующими EGFP или EGFP + TRPC6, инкубировались в условиях частичного опустошения депо ЭПР (присутствие 0,1 мМ внеклеточного Ca^{2+}) в течение 2 минут, а затем внеклеточную среду заменяли на раствор, содержащий 2 мМ Ca^{2+} в присутствии 50 мкМ OAG. Воздействие 50 мкМ самого OAG не вызывало вход Ca^{2+} в EGFP-трансфицированные HEK клетки, наблюдался слабый ответ как на воздействие 50 мкМ OAG, так и при воздействии 30 мкМ 51164 (Рисунок 36 В, Г). Однако TRPC6-экспрессирующие клетки HEK отвечали на воздействие 50 мкМ OAG в условиях частичного опустошения депо ЭПР (Рисунок 36 Г) со средней амплитудой ответа равной $0,25 \pm 0,025$ у.е. ($n = 239$) (Рисунок 36 Г). Воздействие соединением 51164 в концентрации 30 мкМ усиливало кальциевый ответ в TRPC6-экспрессирующих HEK клетках (Рисунок 36 В, Г), со средней амплитудой ответа равной $0,45 \pm 0,05$ у.е. ($n=214$) (Рисунок 36 В, Г), что было достоверно выше чем в отсутствие соединения 51164. Таким образом, полученный результат позволяет заключить, что соединение 51164 действует по механизму аналогичному соединению NSN21778.

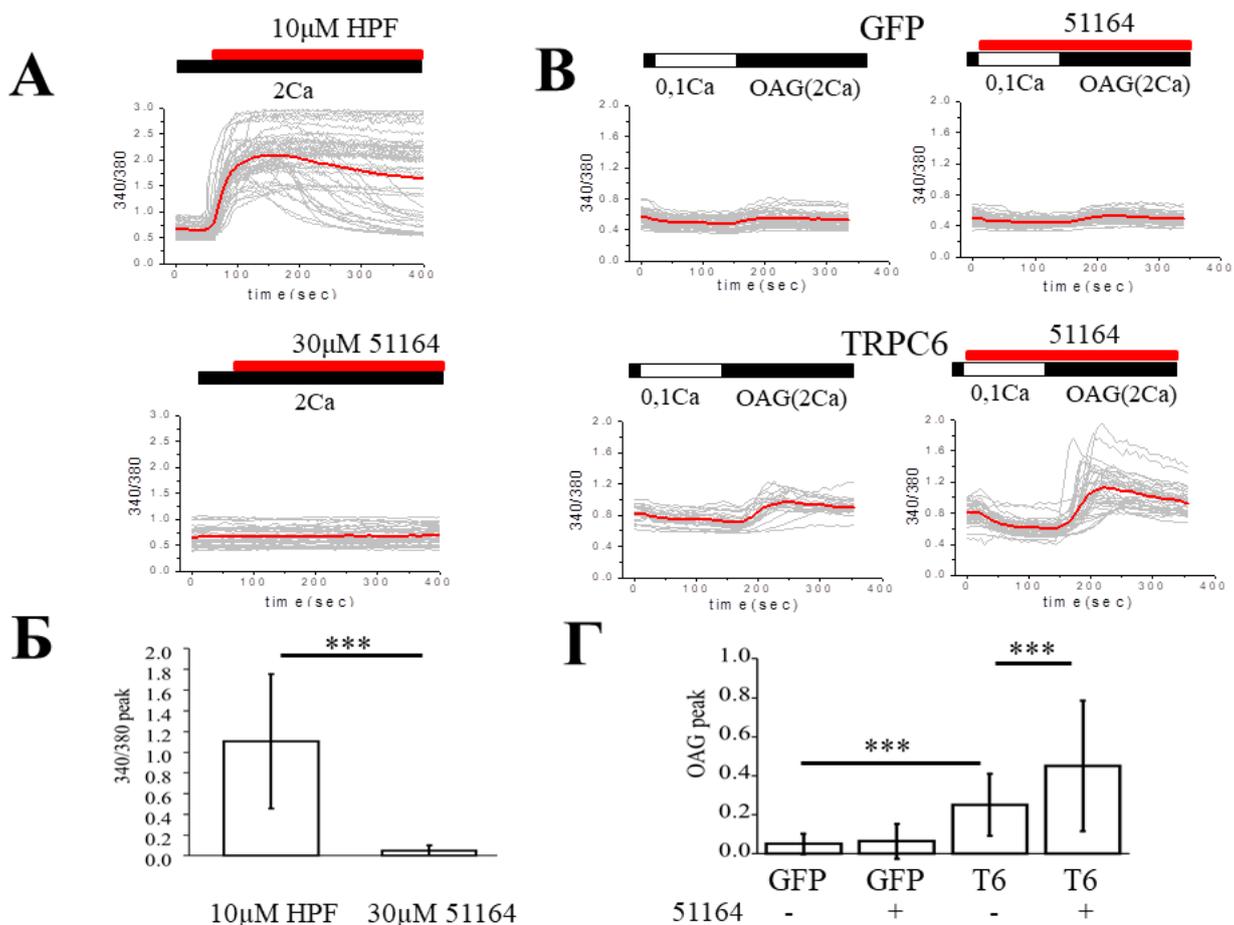


Рисунок 36 Соединение 51164 действует как положительный модулятор каналов TRPC6. (А) График временной зависимости изменения флуоресценции кальций чувствительной краски Fura-2AM (отношение 340/380) показан для клеток HEK293, трансфицированных плазмидами EGFP + TRPC6. Серым цветом выделены кривые соответствующие изменениям флуоресценции в отдельных клетках. Красным цветом выделена усредненная по всем клеткам кривая изменения флуоресценции Fura-2AM. Клетки инкубировали в среде aCSF, содержащей 2 мМ Ca^{2+} . Время добавления 10 мкМ HPF или 30 мкМ соединения 51164 указано красными полосами над кривыми Fura-2. (Б) Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (340/380 пик) в клетках подвергшихся воздействию HPF или соединения 51164. Результаты представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 40$ клеток). *** $p < 0,0001$ по двухфакторному анализу ANOVA, с процедурой множественных сравнений по тесту Tukey. (В) Сравнительный анализ изменения флуоресценции Fura-2AM (отношение 340/380) для клеток HEK293, трансфицированных плазмидами EGFP (GFP) или EGFP + TRPC6 (TRPC6). Следы от отдельных клеток показаны серым цветом, среднее значение по всем клеткам показано красным цветом. Клетки перемещали в модифицированную среду aCSF, содержащую 0,1 мМ Ca^{2+} , в течение 2 минут, а затем возвращали в среду, содержащую 2 мМ Ca^{2+} , с добавлением 50 мкМ OAG. Время добавления 30 мкМ соединения 51164 указано красными

полосами над следами Fura-2AM. (Г) Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (OAG пик) для каждой группы клеток, протестированных в экспериментах, показанных на панели (В). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 40$ клеток). *** $p < 0,0001$ по двухфакторному анализу ANOVA с последующим тестом Tukey.

3.4.4 Соединение 51164 восстанавливает депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности

Чтобы выяснить, активирует ли соединение 51164 эндогенный нДУВК, мы выполнили эксперименты по визуализации кальциевых ответов в культурах гиппокампа трансфицированных GCamp5.3. В день эксперимента покровные стекла с нейронами инкубировали в среде без Ca^{2+} в присутствии блокаторов кальциевых каналов в течение 30 минут. Кальциевый ответ (нДУВК) в дендритных шипиках вызывался добавлением во внеклеточную среду 10мМ Ca^{2+} . Средняя амплитуда ответа, наблюдаемая в синаптических шипиках, в контрольной группе составила 6 ± 2 у.е. ($n = 60$ шипиков из трех независимых культур) (Рисунок 37 К). В качестве референсного соединения использовали гиперфорин. Ранее было показано, что гиперфорин в концентрации 300 нМ способен также активировать каналы TRPC6 по депо-зависимому пути [287]. Средняя амплитуда нДУВК значительно повышалась в присутствии 300 нМ HPF (Рисунок 37 Б, К). В среднем амплитуда нДУВК в присутствии HPF составляла 10 ± 1 у.е. ($n = 60$ шипиков из трех независимых культур) (Рисунок 37 К), что достоверно выше, чем в контрольных условиях ($p < 0,0001$ по Kruskal-Wallis ANOVA). Воздействие на культуру гиппокампа олигомерами А β 42 (100 нМ олигомеры А β 42 присутствовали в культуре в течение 3 дней) вызывало снижение средней амплитуды нДУВК до 4 ± 1 у.е. ($n = 60$ шипиков от трех независимых культур) (Рисунок 37 Г, К), что достоверно ниже, чем в контрольной группе клеток ($p < 0,01$ по Kruskal-Wallis ANOVA). Воздействие на культуру в условиях амилоидной синаптотоксичности 300 нМ HPF вызывало статистически значимое ($p < 0,01$ по Kruskal-Wallis ANOVA) повышение средней амплитуды ответа нДУВК до 10 ± 4 у.е. ($n = 60$ шипиков из трех независимых культуры) (Рисунок 37 Д, К). Инкубация нейронов с соединением 51164 в концентрации 300 нМ также восстанавливала амплитуду нДУВК в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности (Рисунок 37 Е). Средняя амплитуда нДУВК в присутствии соединения 51164 составляла 6 ± 1 у.е. ($n = 60$ шипиков из трех независимых культур) (Рисунок 37 К), что схоже с уровнем ответа нДУВК в контрольных условиях и достоверно выше, чем в культурах, обработанных А β 42 ($p < 0,05$ по Kruskal-Wallis ANOVA). Для дальнейшего подтверждения способности соединения 51164 модулировать TRPC6-зависимый нДУВК нейрональные культуры трансфицировали с

плазмидой, экспрессирующей TRPC6 специфичную shPHK (T6sh). Обнаружено, что отсутствие каналов TRPC6 вызвало подавление амплитуды нДУВК в HPF и в 51164 обработанных нейронах до 4 ± 1 у.е. и 3 ± 1 у.е., соответственно ($p < 0,0001$ по Kruskal-Wallis ANOVA) (Рисунок 37 Ж – К). Таким образом, соединение 51164 способно восстанавливать синаптический TRPC6-зависимый нДУВК в нейронах гиппокампа, подавляемый олигомерами A β 42.

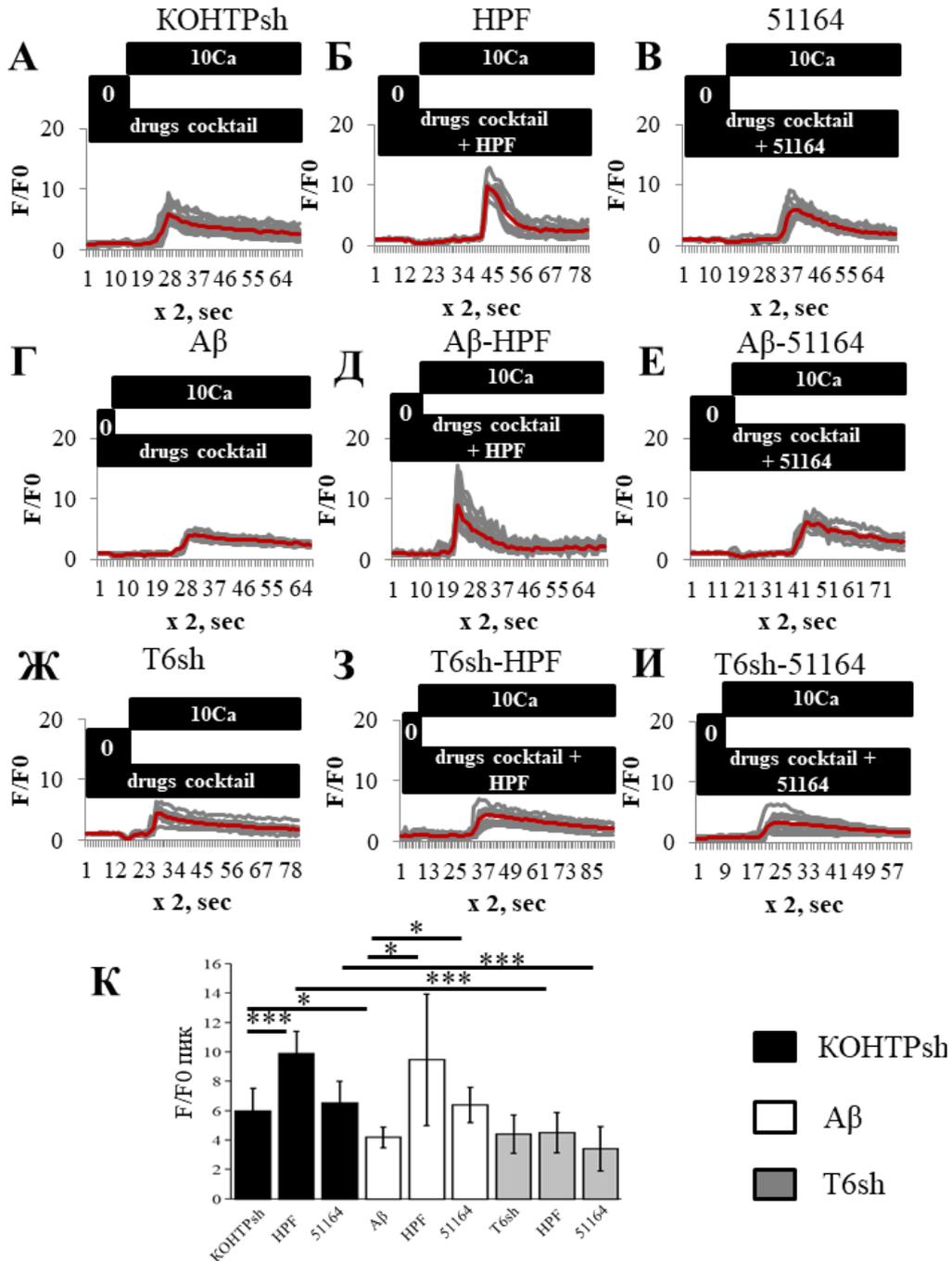


Рисунок 37 Соединение 51164 восстанавливает подавляемый A β 42 нДУВК в дендритных шипиках гиппокампа. (А-И) Примеры записи нДУВК в исследуемых группах. Синаптические кальциевые ответы (F/F₀), регистрировались при помощи кальциевого индикатора GCaMP5.3 в культурах гиппокампа дикого типа (DIV14). Нейроны предварительно инкубировали в среде,

свободной от Ca^{2+} , и добавляли 10 мМ Ca^{2+} , как указано черной полосой над кривыми флуоресценции GCaMP5.3. Эксперименты проводили в присутствии коктейля ингибиторов кальциевых каналов, как описано в разделе «Материалы и методы». Присутствие 300 нМ HPF или 300 нМ соединения 51164 указано выше кривых GCaMP5.3. Для каждой экспериментальной группы показаны индивидуальные кривые флуоресценции каждого шипика (серые линии) и усредненные по всем шипикам (красные линии). Результаты с контрольными (КОНТР) нейронами показаны в (А – В). Результаты с нейронами, предварительно инкубированными с олигомерами A β 42 (A β), показаны в (Г – Е). Результаты, изображенные на (А – Е), были получены в присутствии контрольной shPHK (КОНТРsh). Результаты с нейронами, трансфецированными плазмидами shTRPC6 (T6sh), показаны в (Ж – И). **(К)** Сравнительный анализ изменения амплитуды нДУВК (F/F₀ пик) в исследуемых группах (А – И). Изменения флуоресценции GCaMP5.3 F/F₀ представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 20 шипиков). * p < 0,05; *** p < 0,0005 по Kruskal-Wallis ANOVA.

3.4.5 Соединение 51164 восстанавливает дефицит инициации долговременной потенциации у 6-месячных 5xFAD мышей

Влияние соединения 51164 на ДВП в срезах гиппокампа изучено на трансляционной модели БА, мышцах линии 5xFAD. ДВП индуцировалась по протоколу тетанической импульсной стимуляции в синапсах гиппокампа в области CA1 на проводящих путях Schaffer collateral. Известно, что [136, 192] индукция ДВП в срезах гиппокампа у этих животных значительно снижается к возрасту 6 месяцев (Рисунок 38 А, Б). В среднем через 30 минут после TBS стимуляции относительный наклон полевого возбуждающего постсинаптического потенциала (пВПСП) для срезов WT был $1,62 \pm 0,8$ у.е. (n = 8 срезов), и достоверно ниже для 5xFAD $1,25 \pm 0,2$ у.е. (n=12), (Рисунок 38 Б, p=0,04). Так как соединение 51164 демонстрировало *in vitro* синаптопротекторный эффект в наномолярном диапазоне (10-100 нМ), было решено исследовать его влияние на индукцию ДВП в максимальной исследованной наномолярной концентрации – 100 нМ. Различий в индукции ДВП между 5xFAD и WT мышцами в возрасте 2 месяцев не обнаружено (Рисунок 38 А, В). Инкубация срезов в присутствии 100 нМ соединения 51164 не оказывали влияния на ДВП, зарегистрированную в 2-месячных срезах гиппокампа WT или 5xFAD (Рисунок 38 А, В). Предварительная инкубация срезов гиппокампа 6-месячных животных с 100 нМ соединением 51164 в течение 30 минут не влияла на индукцию ДВП в срезах WT (Рисунок 38 Б, Г, p=0,99). Однако, 30-минутная предварительная обработка срезов гиппокампа с 100 нМ соединением 51164 полностью восстанавливала дефицит индукции ДВП у 5xFAD (Рисунок 38 Б, Г, p = 0,79). В среднем через 30 минут после TBS стимуляции относительный

наклон пВПСП для срезов, обработанных соединением 51164 составлял $1,86 \pm 0,4$ у.е. ($n=9$), достоверно выше ($p=0,02$), чем для срезов 5xFAD без воздействия (Рисунок 38 Б, Г). Таким образом, соединение 51164 оказалось способным восстанавливать дефицит инициации ДВП у 6-месячных мышей линии 5xFAD.

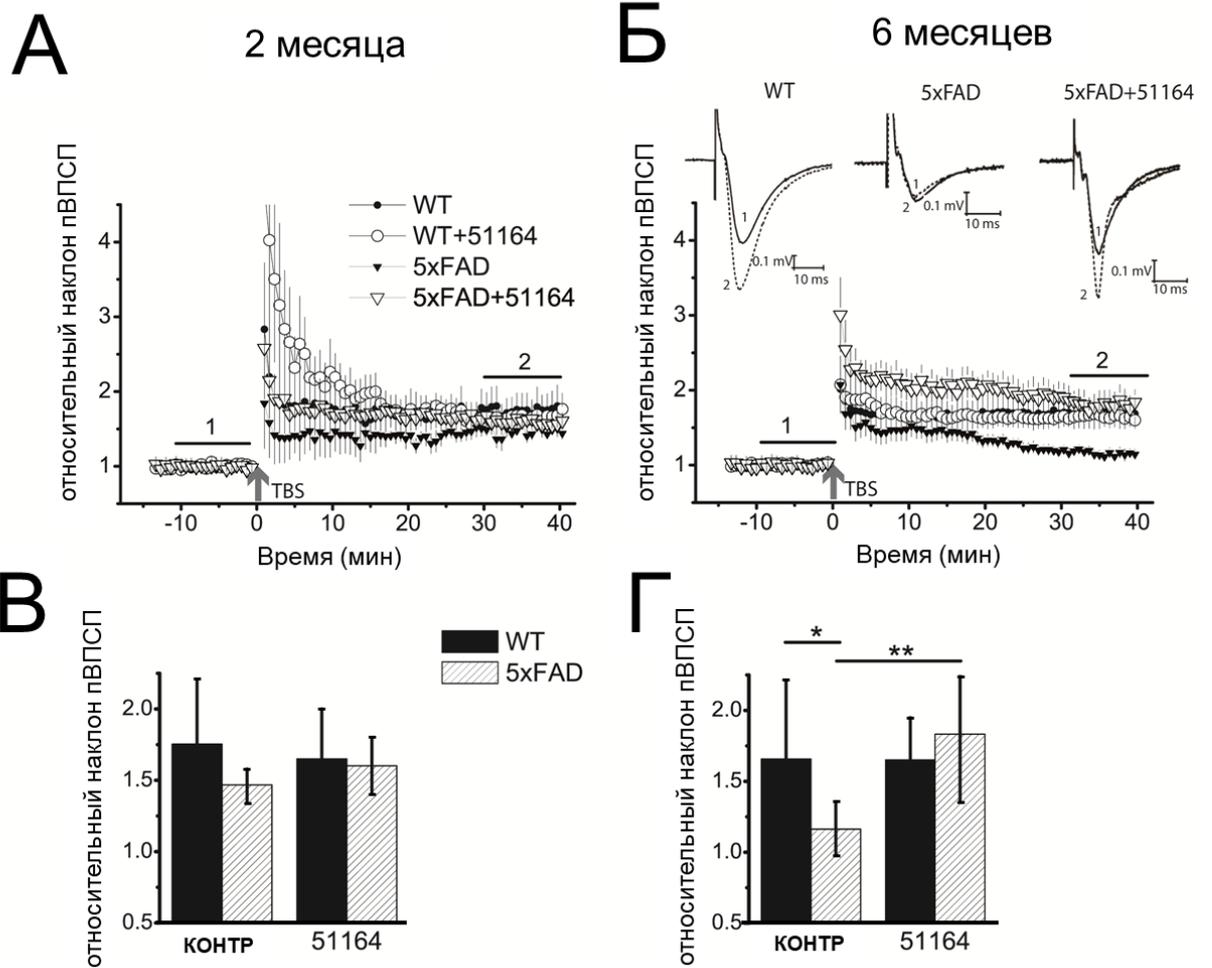


Рисунок 38 Соединение 51164 восстанавливает индукцию ДВП в срезах мозга 6-месячных мышей линии 5xFAD. (А и В) ДВП не изменяется в срезах гиппокампа 2-месячных 5xFAD мышей. Инкубация срезов со 100 нМ 51164 не влияет на индукцию ДВП в срезах мозга мышей WT и 5xFAD в возрасте 2 месяцев (3-5 мышей на группу). Двухфакторный ANOVA, $F_{1,14} = 0,64$, $p = 0,44$ [WT ($n = 4$ среза); WT (51164) ($n = 5$); 5xFAD ($n = 3$); 5xFAD (51164) ($n = 6$)]. (Б и Г) ДВП нарушается в срезах гиппокампа 6-месячных мышей 5xFAD. Инкубация срезов 6-месячных мышей 5xFAD с 100 нМ 51164 восстанавливает индукцию ДВП. Двухфакторный ANOVA с последующим тестом Tukey, $F_{1,31} = 6,31$, $p = 0,02$. В 6-месячных срезах мышей WT соединение 51164 не изменяет ДВП ($p = 0,99$) [WT ($n = 8$); WT (51164) ($n = 6$); 5xFAD ($n = 12$);

5xFAD (51164) (n = 9)]. * p < 0,05; ** p < 0,01 по двухфакторному ANOVA с последующим тестом Tukey.

Заключая раздел, следует отметить, что в поиске потенциальных фармакологических агентов применены подходы биоинформатики для выявления потенциальных активаторов TRPC6. Идентифицированные соединения протестированы в разработанной нами *in vitro* модели амилоидной токсичности. Данные, полученные *in vitro*, позволили отобрать лидирующее соединение 51164, которое проявило нейропротекторные свойства в *in vitro* экспериментах, устранив дефекты инициации ДВП в срезах гиппокампа мышей линии 5xFAD, трансляционной модели БА. Мы полагаем, что соединение 51164 и его аналоги могут быть использованы для разработки лекарственных средств лечения БА. Механизм действия таких соединений ориентирован на синаптическую стабилизацию.

3.5 Антагонист нейронального депо-управляемого входа кальция оказывает протекторное действие на нейроны, экспрессирующие мутантный PSEN1ΔE9, при наследственной форме болезни Альцгеймера

В патогенезе БА отмечено перенасыщение кальцием внутриклеточных депо, включая ЭПР нейронов. В ответ запускаются протекторные механизмы восстановления содержания внутриклеточного кальция до нормы. Однако, судя по литературным данным, активация защитных механизмов со временем может вызвать новые нарушения. Так, было обнаружено, что в нейронах при БА избыток кальция ведет к снижению функции сигнального пути нДУВК, транспортирующего кальций из внеклеточного пространства внутрь клетки [243, 285]. В рамках настоящей диссертационной работы выявлено соединение 51164 - активатор нДУВК, которое на модели амилоидной токсичности восстанавливало синаптические контакты и улучшало когнитивные функции мышей. С нашей точки зрения, соединения-активаторы нДУВК можно рассматривать в качестве потенциальных терапевтических средств лечения БА, однако не для всех фенотипов заболевания. Существуют мутации в пресенилине 1, которые не снижают функцию канала утечки кальция из ЭПР, а наоборот увеличивают, тем самым способствуют высвобождению кальция из ЭПР, одновременно активируют нДУВК. Очевидно, что в данном случае должно быть решение обратной задачи, поиск ингибиторов нДУВК.

Существо гипотезы заключается в том, что при таком подходе возможно поддержание баланса кальция, что необходимо для поддержания стабильности синаптических контактов.

3.5.1 Мутация PSEN1ΔE9 вызывает снижение процента грибовидных шипиков и увеличивает процент тонких шипиков в культуре гиппокампа

Чтобы выяснить влияние мутации PSEN1ΔE9 на формирование и стабильность дендритных шипиков в культурах гиппокампа, мы трансфецировали плазмиду, кодирующую флуоресцентный белок TD-Tomato (для визуализации морфологии постсинаптических дендритных шипиков) вместе с плазмидой, кодирующей мутантный пресенилин 1 с удаленным девятым экзоном 9 (PSEN1ΔE9). Трансфецированные нейроны фиксировали PFA на DIV 15-16, а морфологию дендритных шипов визуализировали на конфокальном микроскопе (Thorlabs, США). Полученные результаты демонстрируют, что гиперэкспрессия мутации PSEN1ΔE9 вызывает потерю грибовидных шипиков с $19\% \pm 2\%$ (n (нейроны) = 12) в контрольной группе (КОНТР) до $6\% \pm 1\%$ (n (нейроны) = 11, $p = 0,0000241$), в нейронах, экспрессирующих мутантный пресенилин (Рисунок 39 В). В соответствии с ранее опубликованными данными [243, 288] мы видим, что баланс смещен в сторону тонких шипиков, с $24\% \pm 2\%$ (n (нейроны) = 12) в контрольной группе до $44\% \pm 6\%$ (n (нейроны) = 11, $p = 0,005$) в нейронах экспрессирующих мутантный PSEN1ΔE9 (Рисунок 39 В). Мутантный PSEN1ΔE9 не влияет на процент пеньковых шипиков (Рисунок 39 В). Плотность шипиков также зависела от экспрессии PSEN1ΔE9. Плотность шипиков уменьшалась с $2,5 \pm 0,2$ шипиков / 10 мкм (n (нейроны) = 12) в контрольной группе до $1,7 \pm 0,2$ шипиков / 10 мкм (n (нейроны) = 11, $p = 0,006$) в PSEN1ΔE9-экспрессирующих нейронах (Рисунок 39 Г).

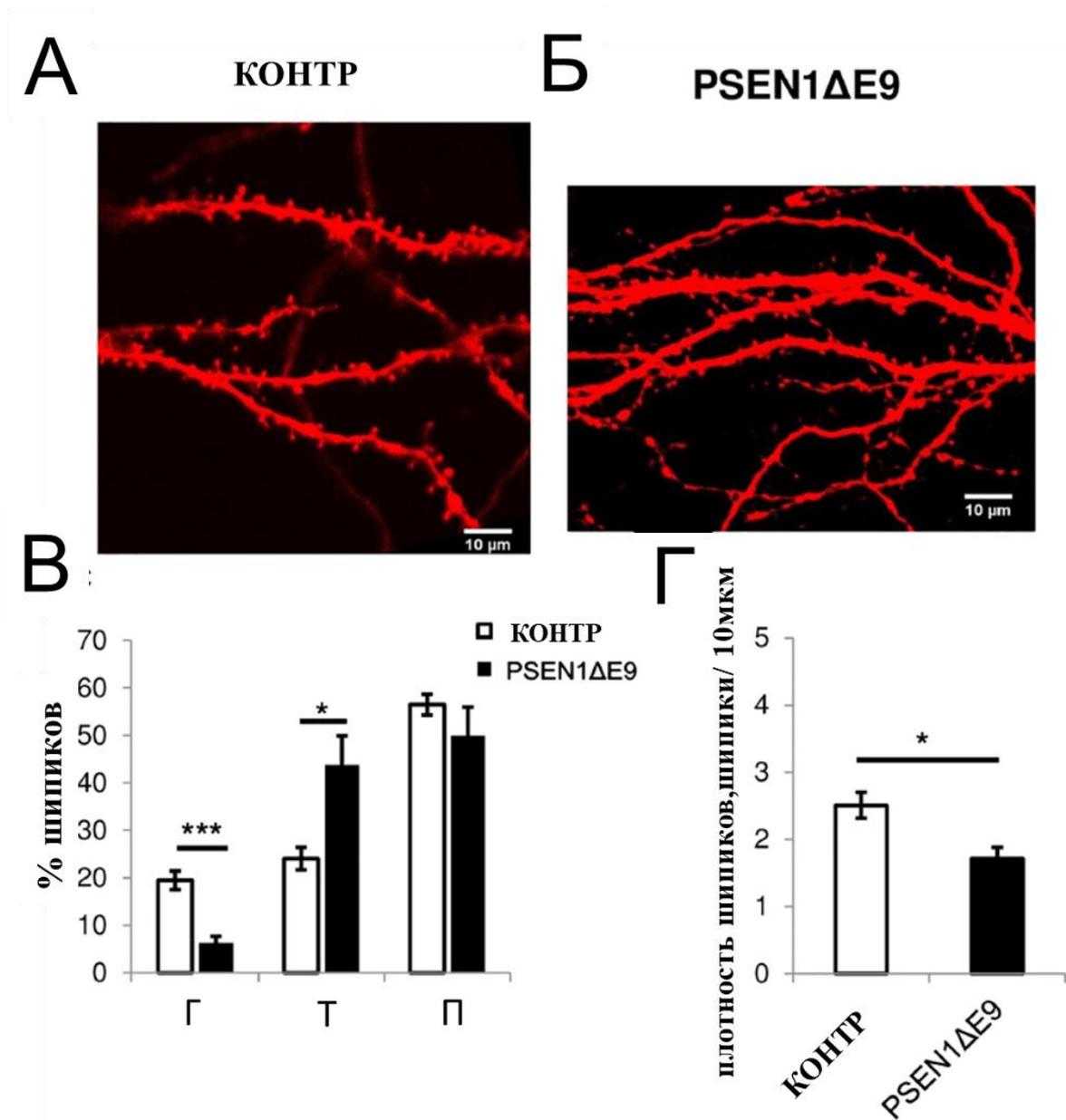


Рисунок 39 Экспрессия PSEN1ΔE9 вызывает уменьшение процента грибовидных и увеличение процента тонких шипиков в нейронах гиппокампа. (А, Б) Репрезентативные конфокальные микрофотографии дендритных шипиков в контрольных нейронах (КОНТР, трансфицированных только TD-Tomato) (А) и в PSEN1ΔE9-экспрессирующих нейронах (PSEN1ΔE9) (Б). (В) Гистограмма со средним процентом грибовидных, тонких и пеньковых шипиков в двух экспериментальных группах, КОНТР и PSEN1ΔE9. (Г) Гистограмма со средней плотностью дендритных шипиков в группах КОНТР и PSEN1ΔE9. Плотность шипиков рассчитывают как сумма всех шипиков на 10 мкм дендрита. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, n (нейроны) = 11–12 на группу из одного эксперимента, эксперимент был повторен четыре раза. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ по однофакторному ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Dunn-Sidak.

3.5.2 Мутация PSEN1ΔE9 увеличивает TRPC6-зависимый депонированный вход кальция в дендритных шипиках в гиппокампальных культурах

Для выявления роли мутации PSEN1ΔE9 в регуляции активности нейронального депонированного входа кальция, выполнены эксперименты по визуализации Ca^{2+} в первичных культурах гиппокампа, совместно трансфицированных плазмидами, экспрессирующими GCaMP5.3 и PSEN1ΔE9 (Рисунок 40).

Установлено значительное увеличение амплитуды нДУБК в дендритных шипиках в культурах гиппокампа, гиперэкспрессирующих мутантный PSEN1ΔE9 (Рисунок 40 Б, Д). Пиковое значение амплитуды нДУБК в нейронах, экспрессирующих PSEN1ΔE9, составляла $10,3 \text{ у.е.} \pm 1,2 \text{ у.е.}$, тогда как в контрольной группе (КОНТР) пиковое значение амплитуды составляло $6,4 \text{ у.е.} \pm 0,4 \text{ у.е.}$, $p = 0,014$ (Рисунок 40 Д). Кроме того, обнаружено, что нокадаун каналов TRPC6 с помощью shTRPC6 РНК в культурах гиппокампа снижает PSEN1ΔE9-опосредованный высокий нДУБК (с $10,3 \text{ у.е.} \pm 1,2 \text{ у.е.}$ для нейронов, экспрессирующих PSEN1ΔE9, до $4,7 \text{ у.е.} \pm 0,7 \text{ у.е.}$, $p = 0,001$ для нейронов, экспрессирующих PSEN1ΔE9, с нокаутированным TRPC6, Рисунок 40 В, Г, Д). Нокадаун TRPC6 вызывает почти полную блокаду индукции нДУБК в первичных культурах гиппокампа с амплитудой пика нДУБК, равной $1,18 \text{ у.е.} \pm 0,02 \text{ у.е.}$ (Рисунок 40 В, Д).

Таким образом, определены возможные мишени для поддержания баланса кальция при фенотипе БА, ассоциированном с PSEN1ΔE9, предпочтительным является ингибирование нДУБК.

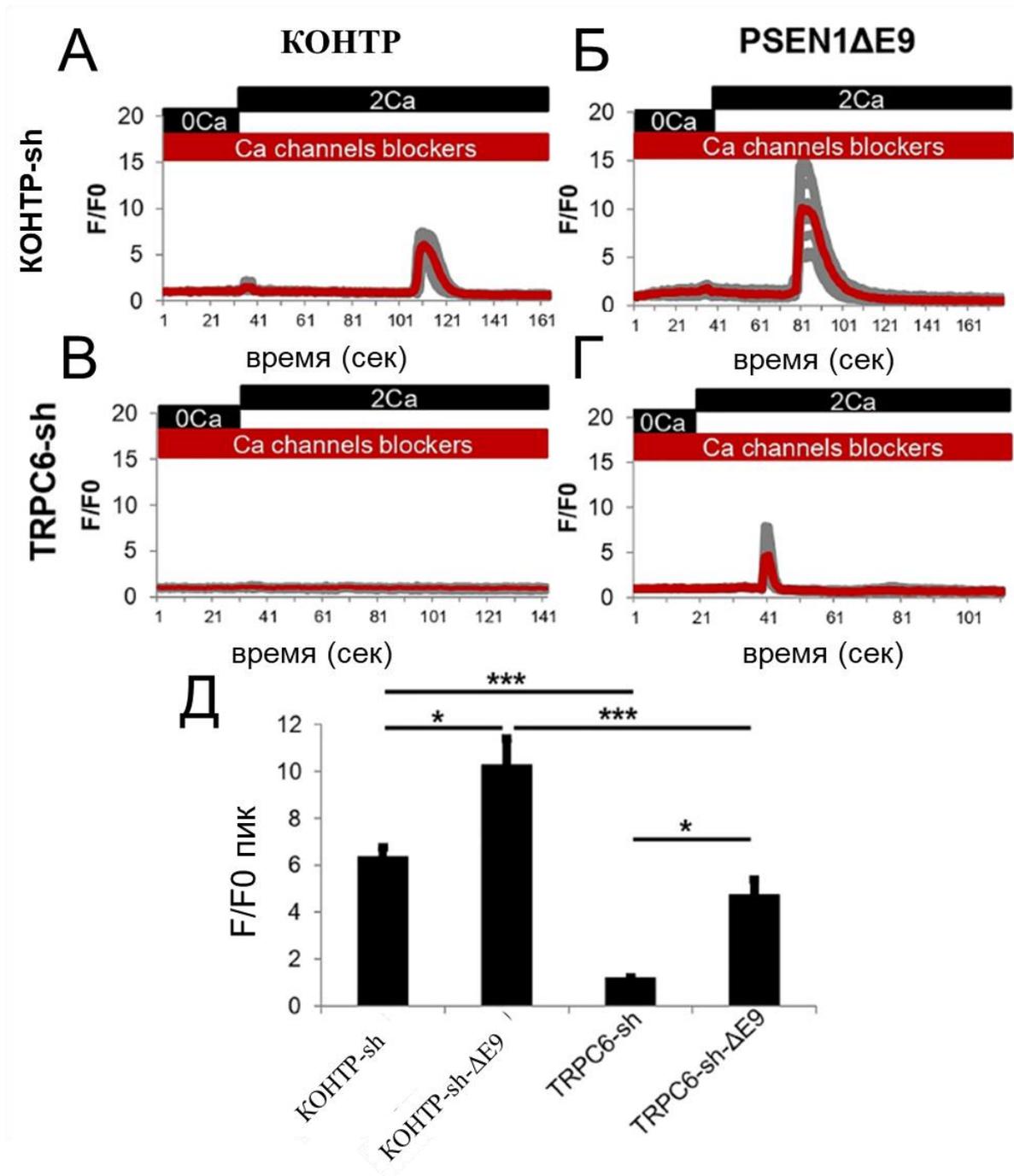


Рисунок 40 Экспрессия PSEN1ΔE9 вызывает увеличение TRPC6-опосредованного нДУВК в дендритных шипиках в первичных культурах гиппокампа. (А – Г) Временная зависимость относительных изменений сигнала флуоресценции GCaMP5.3 (F/F0) в отдельных шипиках нейронов гиппокампа. Наличие блокаторов Ca²⁺-каналов (тапсигаргин, ТТХ, нифедипин, D-AP5, CNQX) обозначено красными полосами. Время внеклеточного добавления 2мМ Ca²⁺ (2Ca) указано черной полосой над кривыми GCaMP5.3. Нейроны были совместно трансфицированы плазмидами CTRL-sh + GCamp5.3 (А), CTRL-sh + GCamp5.3 + PSEN1ΔE9 (Б), TRPC6-sh + GCamp5.3 (В) или TRPC6-sh + GCamp5.3 + PSEN1ΔE9 (Г). Для каждой экспериментальной группы показана индивидуальная кривая флуоресценции каждого шипика

(серая) и средняя по всем шипикам (красная). (Д) Средняя амплитуда пика нДУВК в шипиках показана для каждой группы клеток, приведенных на панелях А – Г. Сигналы средней пиковой амплитуды F/F_0 для каждой экспериментальной группы представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, n (шипы) = 7–10 на группу из одного эксперимента, эксперимент был повторен дважды. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ по однофакторному ANOVA с последующим тестом Dunn-Sidak.

3.5.3 Соединение EVP4593 предотвращает увеличение амплитуды постсинаптического нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах гиппокампа, экспрессирующих PSEN1 Δ E9

Выбор соединения EVP4593 (SML0579, Sigma Aldrich) обоснован литературными данными, показавшими, что EVP4593 блокирует нДУВК в наномолярных концентрациях в нейронах стриатума [274]. Чтобы исследовать опосредованную EVP4593 блокаду нДУВК в нейронах гиппокампа мы провели эксперименты по визуализации кальциевых ответов. Во время процессов визуализации кальциевых осцилляций в среде без кальция (0Ca) добавляли соединение EVP4593 в концентрации 30 нМ вместе с блокаторами кальциевых каналов плазматической мембраны – CNQX (AMPA/ каинатные рецепторы), D-AP5 (NMDAR), нифедипином (L-VGCC) и TTX (блокирует спонтанную активность нейронов) тапсигаргином (блокатор SERCA) (Рисунок 41). В качестве дополнительного контроля визуализировали нДУВК в дендритных шипиках экспрессирующих пресенилин 1 дикого типа (PSEN1WT) (Рисунок 41 В, Г, Ж). Выявлено, что PSEN1WT не увеличивает амплитуду нДУВК в нейронах гиппокампа, демонстрируя пиковую амплитуду нДУВК $3,12 \pm 0,13$ у.е. в сравнении со значением пиковой амплитуды нДУВК для контрольной группы (КОНТР) $3,21 \pm 0,25$ у.е., $p = 0,73$ (Рисунок 41 А, В, Ж), что согласуется с ранее опубликованными данными о том, что холопротеин PSEN1WT не увеличивает функцию пресенилина 1 как канала утечки Ca^{2+} из ЭПР, таким образом, не приводит к опустошению кальциевых депо в ЭПР [259]. Мы также обнаружили, что в контрольной группе (КОНТР) нейронов EVP4593 не снижает амплитуду нДУВК (Рисунок 41 А, Б, Ж). Однако 30 нМ EVP4593 блокирует PSEN1 Δ E9-опосредованное увеличение амплитуды нДУВК с $7,22 \pm 0,97$ у.е. до $3,71 \pm 0,16$ у.е., $p = 0,009$ (Рисунок 41 Д, Е, Ж). Специфичность эффекта для изученного фенотипа подтверждается отсутствием блокады постсинаптического нДУВК в PSEN1WT гиперэкспрессирующих нейронах (Рисунок 41 В, Г, Ж).

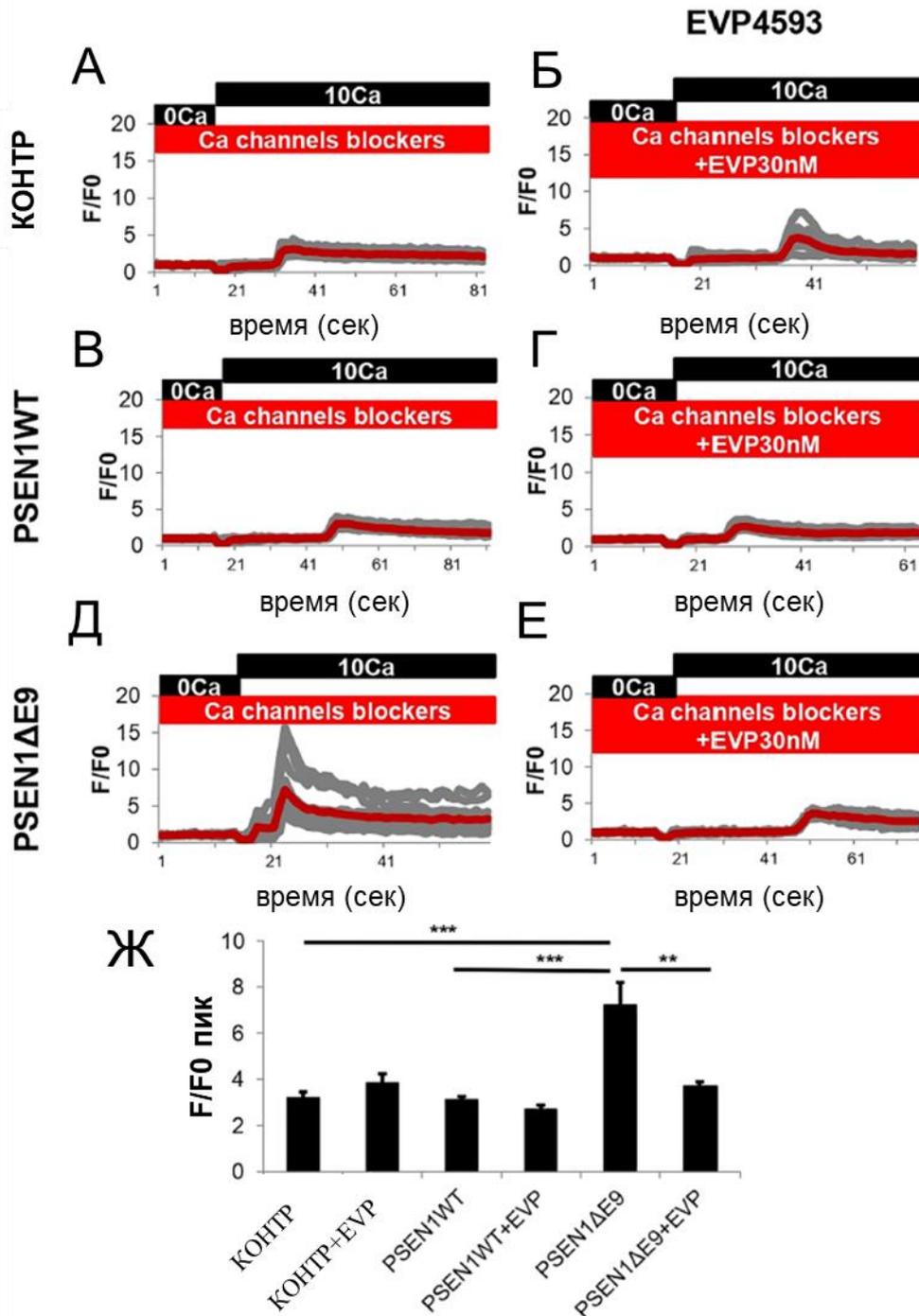


Рисунок 41 Соединение EVP4593 ингибирует PSEN1ΔE9-опосредованное увеличение амплитуды нДУВК в постсинаптических шипиках гиппокампа. (А – Е) Временная зависимость относительных изменений сигнала флуоресценции GCaMP5.3 (F/F₀) в отдельных шипиках нейронов гиппокампа. Наличие блокаторов Ca²⁺-каналов (тапсигаргин, ТТХ, нифедипин, D-AP5, CNQX± EVP4593) обозначено красными полосами. Время внеклеточного добавления 10мМ Ca²⁺ (10 Ca) указано черной полосой над кривыми GCaMP5.3. Результаты показаны для контрольных условий (А, В, Д) и для клеток, инкубированных с EVP4593 (Б, Г, Е). Эксперименты проводили с контрольными клетками (без трансфекции PSEN1 конструктами) (А,

Б), клетками, трансфицированными PSEN1WT (В, Г), и клетками, трансфицированными PSEN1ΔE9 (Д, Е). Для каждой экспериментальной группы показана индивидуальная кривая флуоресценции каждого шипика (серая) и средняя по всем шипикам (красная). **(Ж)** Средняя амплитуда пика постсинаптического нДУБК показана для каждой группы клеток, приведенных на панелях А – Е. Сигналы средней пиковой амплитуды F/F0 для каждой экспериментальной группы представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, n (шипы) = 8–14 на группу из одного эксперимента, эксперимент был повторен дважды. * p < 0,05, *** p < 0,0005 по двухфакторному ANOVA с последующим тестом Tukey.

3.5.4 Соединение EVP4593 увеличивает процент грибовидных шипиков в культуре гиппокампа экспрессирующей PSEN1ΔE9

Фармакодинамическое изучение нейропротекторного влияния EVP4593 продолжено в первичных культурах гиппокампа. Оценивали содержание грибовидных шипиков при гиперэкспрессии PSEN1WT в качестве контроля, для подтверждения что гибель грибовидных шипиков в нейронах, экспрессирующих PSEN1ΔE9, происходит из-за делеции 9го экзона в белке PS1, но не из-за эффекта гиперэкспрессии гена PSEN1.

Мы наблюдали, что гиперэкспрессия PSEN1WT имеет тенденцию к уменьшению процента грибовидных шипиков, однако она не достигает уровня статистической значимости $14,14\% \pm 1,78\%$ (группа PSEN1WT, Рисунок 42 Б) по сравнению с $19,47\% \pm 1,96\%$ (группа КОНТР, Рисунок 42 Б), p = 0,07. Между тем, процент грибовидных шипиков в нейронах, экспрессирующих PSEN1WT, значительно выше по сравнению с нейронами, экспрессирующими PSEN1ΔE9, $14,14\% \pm 1,78\%$ (группа PSEN1WT, Рисунок 42 Б) против $6,28\% \pm 1,40\%$ (группа PSEN1ΔE9, Рисунок 42 Б), p = 0,007.

Кроме того, плотность шипиков в PSEN1WT и PSEN1ΔE9 трансфицированных нейронах была также статистически разной, составляя $3,1 \pm 0,4$ шипов / 10 мкм (n (нейроны) = 8) в PSEN1WT группе против $1,8 \pm 0,2$ шипов / 10 мкм (n (нейроны) = 11, p = 0,01) в PSEN1ΔE9 группе (Рисунок 42 Д). Инкубация с 30 нМ EVP4593 вызывает гибель грибовидных шипиков в контрольной группе нейронов (Рисунок 42 Б). В среднем процент грибовидных шипиков сокращался до $13,8\% \pm 1,3\%$ (n (нейроны) = 10) в контрольных нейронах, обработанных EVP4593, но это не подтверждалось уровнем статистической значимости. Добавление 30 нМ EVP4593 в PSEN1WT-экспрессирующие нейроны достоверно не изменяло процент грибовидных шипиков, хотя наблюдалась негативная тенденция (Рисунок 42 Б). В среднем, процент грибовидных шипиков сокращался до $12,5\% \pm 2,4\%$ (n (нейроны) = 7) в PSEN1WT-трансфицированных нейронах, обработанных EVP4593 (Рисунок 42 Б).

EVP4593 значительно увеличивал процент тонких шипиков до значения $48\% \pm 4\%$ (n (нейроны) = 7, $p = 0,003$) по сравнению с PSEN1WT-экспрессирующими нейронами, где процент тонких шипиков составлял $32\% \pm 3\%$ (n (нейроны) = 8) и значительно снижал процент пеньковых шипиков до значения $40\% \pm 4\%$ (n (нейроны) = 7, $p = 0,01$) по сравнению с PSEN1WT-экспрессирующими нейронами, где процент пеньковых шипиков составлял $54\% \pm 3\%$, (n (нейроны) = 8) в PSEN1WT-трансфицированных нейронах (Рисунок 42 В, Г). Однако, инкубация с 30 нМ EVP4593 восстанавливала процент грибовидных шипиков в PSEN1 Δ E9-трансфицированных нейронах (Рисунок 42 Б). В среднем процент грибовидных шипиков увеличивался до $12\% \pm 2\%$ (n (нейроны) = 7, $p = 0,007$) после обработки EVP4593 PSEN1 Δ E9-трансфицированных нейронов (Рисунок 42 Б). Была тенденция EVP4593 к снижению процента тонких шипиков, однако она не достигала уровня статистической значимости (Рисунок 42 В). EVP4593 не влияет на процент пеньковых шипиков в PSEN1 Δ E9-трансфицированных нейронах. (Рисунок 42 Г). Кроме того, EVP4593 не увеличил плотность шипиков в PSEN1 Δ E9-экспрессирующих нейронах (Рисунок 42 Д). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу рабочей гипотезы о том, что блокировка активности нДУБК в нейронах гиппокампа, экспрессирующих мутантный PSEN1 Δ E9, оказывает нейропротекторное действие на дендритные шипики.

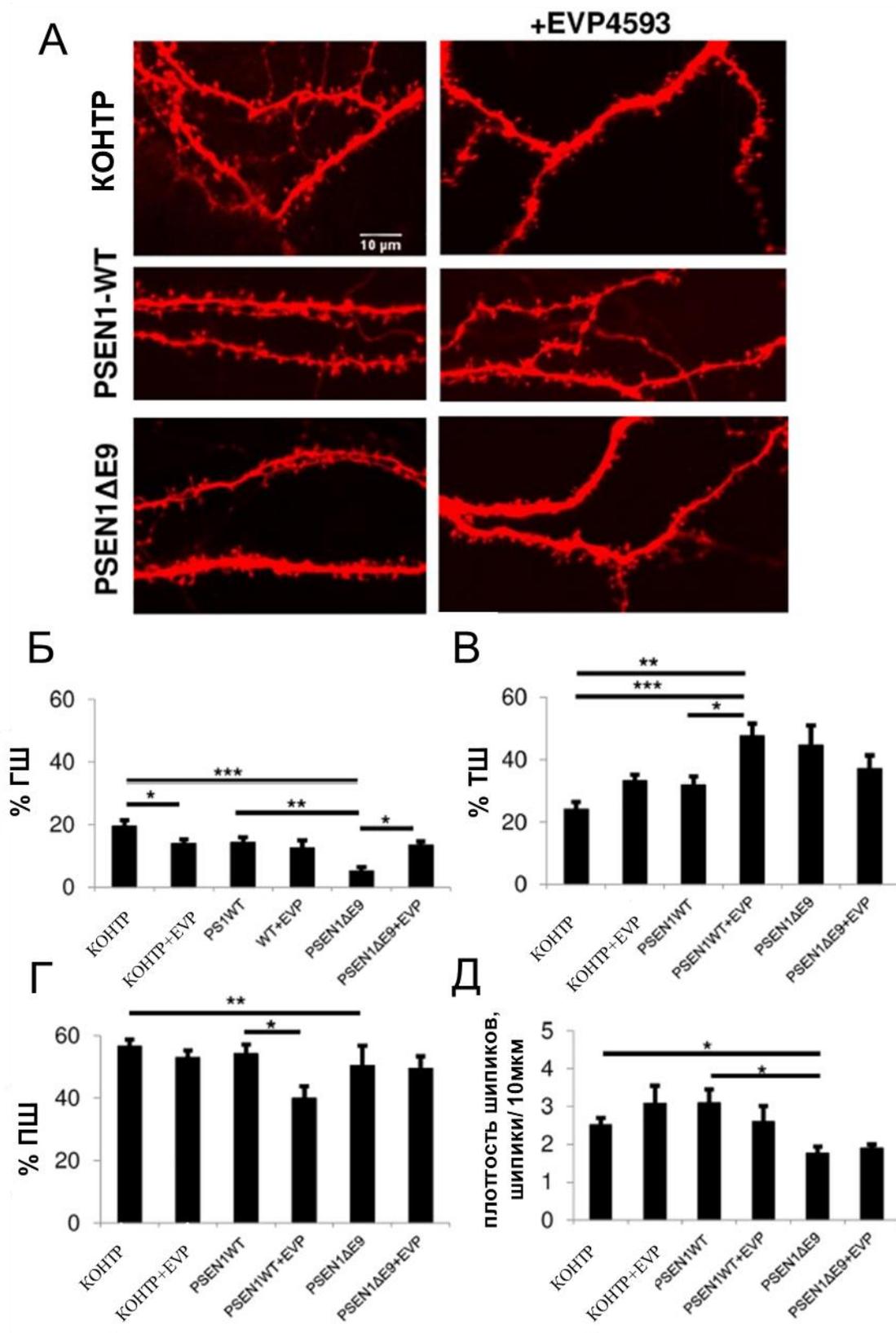


Рисунок 42 Соединение EVP4593 в концентрации 30 нМ восстанавливает процент грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа, экспрессирующих мутантный PSEN1ΔE9. (А) Репрезентативные конфокальные микрофотографии культур гиппокампа, трансфицированных только плазмидой TD-Tomato, TD-Tomato + PSEN1WT и TD-Tomato +

PSEN1ΔE9. Результаты показаны для контрольных условий (левые панели) и для нейронов, инкубированных с 30 нМ EVP4593 в течение 16 ч до фиксации и визуализации (правые панели). **(Б, В, Г)** Гистограмма демонстрирующая средний процента грибовидных шипиков (ГШ) / тонких шипиков (ТШ) и пеньковых шипиков (ПШ) для каждой экспериментальной группы, изображенной на панели А. **(Д)** Гистограмма со средней плотностью дендритных шипиков для каждой экспериментальные группы изображённой на панели А. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего, n (нейроны) = 7–12 на группу из одного эксперимента, эксперимент был повторен дважды. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ по двухфакторному ANOVA, с последующим множественным сравнением по тесту Tukey.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на десятилетия научных и клинических исследований, до сих пор нет эффективного препарата способного остановить прогрессирование болезни Альцгеймера. Большинство недавних клинических испытаний было направлено на подавление токсических последствий бета амилоида, но все эти испытания оказались неудачными. Хотя амилоидная патология является отличительным и определяющим признаком БА, нацеливание фармакологической терапии на амилоидогенный путь является очень сложным из-за низкой эффективности существующих в настоящий момент препаратов и серьезных побочных эффектов.

Необходимо рассматривать альтернативные внутриклеточные сигнальные пути которые помогут понять основную причину потери памяти у пациентов с БА. Все больше исследований показывают, что дисрегуляция кальциевого гомеостаза в нейронах при БА играет важную роль в развитии данной патологии и связана с другими нарушениями наблюдаемыми при БА, такие как чрезмерное воспаление, повышение активных форм кислорода, нарушение аутофагии, нейродегенерация, синаптическая и когнитивная дисфункция. Нарушение регуляции Ca^{2+} - зависимых сигнальных путей в цитозольном пространстве, в ЭПР и митохондриях были описаны в контексте различных моделей БА. Существует достаточно экспериментальных подтверждений того, что препараты или стратегии для коррекции кальциевой дисрегуляции при БА имеют перспективный подход для лечения БА в доклинических моделях.

4.1 Нарушения регуляции транспорта кальция депо-управляемыми кальциевыми каналами, как при гипо-, так и гиперактивации, ведут к снижению стабильных грибовидных шипиков в гиппокампе

В настоящей работе для достижения условий амилоидной токсичности использовали олигомеры Аβ42 в начальной концентрации 100 нМ. Согласно литературным данным ранее Аβ42 в такой низкой концентрации не использовался. Мы сознательно старались найти минимальную токсичную дозу Аβ42 с целью имитации начальной стадии болезни. Мы предполагаем, что применение фармакологических агентов на ранних стадиях может значительно снизить темпы развития БА. Мы показали, что в 100 нМ концентрации Аβ42 достоверно повышает восприимчивость нейронов гиппокампа к глутаматной эксайтотоксичности (Рисунок 11),

повышает концентрацию кальция в ЭПР (Рисунок 13), снижает амплитуду нейронального депо-управляемого входа кальция (Рисунок 14), вызывает дестабилизацию синаптических контактов (Рисунок 15) и снижает процент грибовидных шипиков (Рисунок 16).

Мы обнаружили, что гиперактивированный нДУВК в генетической модели БА, экспрессирующей мутантный PSEN1 Δ E9, вызывает дестабилизацию дендритных шипиков, что выражается в снижении процента грибовидных шипиков в культивируемых нейронах гиппокампа (Рисунок 39). Таким образом, нами получено экспериментальное подтверждение целесообразности поиска как активаторов, так и ингибиторов нДУВК для разработки фармакологической терапии патогенетических форм болезни Альцгеймера.

4.2 Манипуляция уровнем экспрессии белка STIM2 в гиппокампе мышей демонстрирует терапевтический эффект

Нарушение сигнального пути STIM2-нДУВК также наблюдается в недавно разработанной нокиновой мышинной модели APPKI [288] и мышинной модели PS1-M146V-KI [243]. В настоящей диссертационной работе мы обнаружили, что уровни экспрессии белка STIM2 снижены в нейрональных культурах, подвергшихся воздействию олигомеров A β 42 и A β 40 (Рисунок 17) и в гиппокампе мышей после инъекции олигомеров A β 42-555 (Рисунок 20). Было также обнаружено, что амилоидные олигомеры оказывают влияние на экспрессию белка STIM2 *in vitro* и *in vivo*, в то время как экспрессия белка STIM1 не менялась в *in vitro* условиях и статистически значимо изменялась в *in vivo* условиях (Рисунок 17, Рисунок 20). Схожие результаты были получены в мышинной модели БА PS1-M146V-KI. Однако влияние на экспрессию STIM2 было менее драматичным в условиях амилоидной токсичности, чем в экспериментах с нейронами PS1-M146V-KI [243]. Предполагается, что подавление сигнального пути STIM2-нДУВК является основным механизмом, ответственным за потерю грибовидных шипиков в условиях переполнения кальциевых депо ЭПР в модели кальциевой дисрегуляции БА, мышцах PS1-M146V-KI [243, 286]. В то время как, олигомеры A β 42 будут также воздействовать на другие постсинаптические Ca²⁺-зависимые молекулярные мишени, такие как NMDAR [149] и mGluR5 [212, 261]. При этом подавление пути STIM2-нДУВК будет происходить как вторичное событие. Интересно, что A β 40 достоверно снижает экспрессию STIM2, но не влияет на экспрессию pCaMKII (Рисунок 17) и устойчивость грибовидных шипиков (Рисунок 16). Мы предполагаем, что A β 40 в наномолярной концентрации не влияет на синаптические Ca²⁺-зависимые каналы. Следовательно, в наших экспериментальных условиях A β 40 не является токсичным, не вызывает снижения экспрессии синаптической pCaMKII и не влияет на процент грибовидных шипиков.

Мы показали, что гиперэкспрессия белка STIM2 защищает грибовидные шипики в культурах гиппокампа, подвергшихся воздействию олигомеров A β 42 (Рисунок 18), восстанавливает процент грибовидных шипиков (Рисунок 21) и уровни экспрессии pCaMKII (Рисунок 22) в гиппокампе мышей инъецированных олигомерами A β 42. Более того мы доказали терапевтическую эффективность повышенной экспрессии белка STIM2 в мышинной модели БА, мышцах линии 5xFAD. В своем генотипе эти мыши имеют пять мутаций, при этом две из них вызывают нарушения в функционировании белка PSEN1, а три кодируют мутантный человеческий белок APP. Мыши этой линии проявляют когнитивные нарушения уже в 4-месячном возрасте, а появление амилоидных бляшек зафиксировано еще раньше – в возрасте двух месяцев [136, 192]. В настоящей работе установлено, что снижение экспрессии белка STIM2 наблюдается уже в возрасте 4 месяцев. В данном возрасте снижение экспрессии белка STIM2 предшествует снижению экспрессии синаптического маркера – белка PSD95 (Рисунок 23). В возрасте 6 месяцев происходит значительное снижение экспрессии как белка STIM2, так и белка PSD95 (Рисунок 23). Полученные результаты позволили предположить, что наиболее эффективным (с терапевтической точки зрения) временем для активации пути STIM2–нДУВК должна быть ранняя стадия болезни, когда уже присутствуют нарушения кальциевой (Рисунок 23) и амилоидной (Рисунок 24) сигнализации, но они еще не приводят к значительным когнитивным расстройствам. В итоге проведенного исследования обнаружено, что активация пути STIM2–нДУВК посредством гиперэкспрессии STIM2 в гиппокампе мышей линии 5xFAD на ранней стадии заболевания (в возрасте 2 мес) способна замедлить развитие патологии БА, что выражается в снижении количества амилоидных бляшек в коре головного мозга в возрасте 3,5 мес. (шесть недель после активации пути STIM2–нДУВК) (Рисунок 25).

На основании полученных нами результатов мы полагаем, что повышенная активность пути STIM2-нДУВК является достаточной для восстановления активности синаптической CaMKII, что способствует защите грибовидных шипиков в условиях амилоидной токсичности. Таким образом, мы полагаем, что активаторы сигнального пути STIM2-нДУВК являются перспективными терапевтическими препаратами для лечения БА.

Однако терапевтический подход на основе генетической манипуляция уровнем экспрессии белка STIM2 с помощью ленти- или аденоассоциированных вирусов имеет малые шансы на успех т.к. имеются ограничения в использовании вирусов для лечения заболеваний человека [184, 292]. Кроме того, STIM2 также участвует в других сигнальных путях (формирование микротрубочек и регуляция активности AMPAR) [91, 201], повышенная активность которых на протяжении длительного времени может давать побочные эффекты.

4.3 Потенциальные фармакологические агенты на основе активаторов TRPC6 каналов

Результаты полученные в настоящей работе, а также литературные данные свидетельствуют о том, что каналы плазматической мембраны TRPC6, образующие троичный комплекс TRPC6/ Orai2/ STIM2, и регулирующие активность нДУВК в нейронах гиппокампа могут представлять собой привлекательную молекулярную мишень для разработки лекарственной терапии от БА. Существует также генетическое подтверждение того, что TRPC6 участвует в патогенезе БА. Снижение экспрессии мРНК TRPC6 наблюдалось у пациентов с БА и легкой степенью когнитивных нарушений [167].

Ранее было показано, что подавление синаптического механизма нДУВК может способствовать синаптической потере при БА [243, 288]. Кроме того, охарактеризовано соединение NSN21778, которое является агонистом TRPC6-опосредованного нДУВК в гиппокампальных нейронах и показано, что это соединение способно предотвратить синаптическую потерю и восстановить дефекты ДВП в срезах гиппокампа мышей моделей БА [287]. Однако обнаружилось некоторые ограничения на использование соединения NSN21778 в качестве потенциального терапевтического агента. Соединение NSN21778 не обладает оптимальными фармакокинетическими свойствами и обладает плохой проницаемостью через гематоэнцефалический барьер.

Еще один известный активатор каналов TRPC6 – гиперфорин (HPF) [156]. Гиперфорин является натуральным экстрактом из травы зверобоя и показывает нейропротекторные свойства на разных мышинных моделях БА [7, 44, 72, 118]. Нейропротекторный механизм гиперфорина может быть связан с повышенным уровнем фосфорилирования CREB [94], активацией сигнальных путей RAS / MEK / ERK, PI3K и CAMKIV [111], с сохранением функций митохондрий [297], а также с восстановлением нДУВК [287]. Однако основными недостатками гиперфорина, в качестве препарата от БА, является высокая стоимость химического синтеза [254], а также его нестабильность на свету. Кроме того гиперфорин имеет токсическое побочное действие заключающееся в расстройстве желудочно-кишечного тракта [70, 271].

Мы использовали нашу *in vitro* модель для исследования нейропротекторных свойств нового химического соединения N17. Мы обнаружили, что N17 способен защищать грибовидные шипики от амилоидной токсичности в концентрации 100 нМ (Рисунок 26). Кроме того, мы показали что механизм действия N17 может быть связан с активацией TRPC6-зависимого нДУВКа в синаптических шипиках гиппокампальных нейронов (Рисунок 28). Кроме того, в рамках диссертационной работы обнаружены нейропротекторные свойства у соединения N17 в *in vivo* модели ишемии головного мозга. На модели экспериментальной ишемии у крыс

соединение N17 при разовом внутривнутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг уменьшает количество ошибок, совершаемых животными во время исследования поведения животных в тесте лабиринт Барнса на следующий день после ишемии. Преимущественное влияние соединения оказывало на воспроизведение, а не на запоминание информации [3]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что N17 представляет интерес для дальнейших исследований в качестве нейропротекторного средства. Однако выбор N17 в качестве лидирующего соединения для разработки нового активатора каналов TRPC6 является неоправданным из-за вероятного наличия кросспецифичности соединения N17 к другим клеточным рецепторам т.к. изначально N17 разрабатывался как препарат с холиномиметическими и противогипоксическими свойствами [1, 4].

В настоящей диссертационной работе мы сосредоточились на поиске активаторов каналов TRPC6, имеющих отличную от NSN21778 или HPF химическую структуру. Мы предполагаем, что такие молекулы являются перспективными агентами для разработки новых терапевтических препаратов для лечения БА. Мы провели биоинформатический поиск потенциальных агонистов и модуляторов каналов TRPC6 и выявили шесть молекул-кандидатов в базе данных Integrity (Clarivate Analytics) (Таблица 3). Однако большинство из этих молекул не были доступны для экспериментальных исследований. Поэтому мы нашли несколько аналогов этих молекул в химической библиотеке InterBioScreen (Черноголовка, Россия). На основании самого высокого процента совпадения со структурой желаемого соединения, мы выбрали четыре соединения-кандидата для тестирования. Далее мы выполнили биоинформатический анализ этих соединений с использованием программы PASS [83], и установили, что соединения 50741 и 51164 не демонстрируют такие токсические эффекты как канцерогенность, токсичности для кардио- / сосудистой или дыхательной систем. Мы исследовали нейропротекторные свойства этих соединений в разработанной нами *in vitro* модели низкой амилоидной токсичности. В наших экспериментах HPF использовался в качестве положительного контроля, так как это хорошо зарекомендовавший себя активатор TRPC6, который восстанавливает процент грибовидных шипиков в мышечных моделях БА [287]. На основании полученных нами результатов (Рисунок 35, 36, 37) мы выбрали соединение 51164 как ведущую молекулу для разработки лекарственного препарата. Это соединение смогло восстановить A β 42-индуцированную потерю грибовидных шипиков в концентрации 10 нМ (Рисунок 35), и оно также демонстрирует благоприятный профиль токсичности по предсказаниям программы PASS.

Соединение 51164 является производным пиперазина (PPZ) (Таблица 3). Ранее было показано, что производные PPZ активируют каналы TRPC6 [34], с последующей активацией сигнального пути BDNF [224]. Мы оценили способность соединения 51164 активировать каналы TRPC6 в экспериментах с трансфицированными HEK клетками. Мы обнаружили, что это

соединение не является прямым активатором каналов TRPC6 в стандартных условиях записи кальциевых осцилляций, но действует как положительный модулятор OAG-опосредованной активации каналов TRPC6 (Рисунок 36). То есть механизм действия этого соединения отличается от HPF и похож на механизм действия соединения NSN21778 [287]. Эффективная концентрация соединения 51164 в экспериментах по записи кальциевых ответов в трансфицированных клетках составила 30 мкМ аналогично концентрации соединения PPZ2 (2-[4-(2,3-диметилфенил)пиперазин-1-ил]-N-(2-этоксифенил)ацетамид), необходимой для активации каналов TRPC6 в схожих экспериментах [224]. Савамура и др. 2016 предполагают, что PPZ1 ([4-(5-хлор-2-метилфенил)пиперазин-1-ил](3-фторфенил)метанон) и PPZ2 активирует каналы TRPC6 диацилглицерол-зависимым путем, но нейропротекторный эффект их соединений осуществляется путем активации сигнального пути BDNF [224]. Мы далее показали, что соединение 51164 способно восстанавливать синаптический нДУВК в нейронах гиппокампа, подвергшихся воздействию A β 42 (Рисунок 37). Обнаруженные в настоящей работе нейропротекторные свойства соединения 51164 аналогичны результатам, которые были ранее получены с соединением NSN21778 [287]. Ранее было показано, что производные PPZ способны активировать вход ионов Ca²⁺ не только через каналы TRPC6, но и через каналы TRPC3 и TRPC7 [224]. Данный результат имеет прямое отношение к разработке лекарств так как каналы TRPC3 и TRPC7 экспрессируются и являются преобладающими изоформами каналов TRPC в различных областях мозга, таких как мозжечок, обонятельные луковицы и ствол головного мозга [287]. Мы не оценивали способность соединения 51164 активировать другие изоформы TRPC. Для дальнейшей оценки нейропротекторных свойств соединения 51164, мы выполнили серию экспериментов по записи ДВП в срезах гиппокампа мышей линии 5xFAD. 5xFAD мыши являются агрессивной моделью БА, которые демонстрируют амилоидные бляшки и когнитивную дисфункцию уже в возрасте 4х месяцев [136, 192]. В соответствии с опубликованными ранее результатами мы наблюдали дефекты в инициации ДВП в гиппокампальных срезах 6-месячных мышей 5xFAD (Рисунок 38). Преинкубация срезов с 100 нМ соединением 51164 восстанавливала дефекты ДВП (Рисунок 38), предполагая, что это соединение может быть использовано для лечения нарушений синаптической пластичности при БА.

В заключение, в текущем диссертационной работе мы определили и охарактеризовали соединение 51164 как потенциальную молекулу для разработки терапевтического препарата для лечения БА. Это соединение является производным пиперазина, класс молекул, широко используемых для лечения психических расстройств [133]. Наши данные свидетельствуют о том, что соединение 51164 действует как положительный модулятор каналов TRPC6, приводящий к стабилизации синаптических шипиков гиппокампа в условиях амилоидной токсичности и восстанавливающий дефекты ДВП в срезах гиппокампа мышинной модели БА. Соединение 51164

показало нейропротекторные свойства в концентрациях 10–100 нМ, и по прогнозам программы PASS должно иметь благоприятный профиль токсичности. Таким образом, 51164 и его производные представляют собой перспективные молекулы для разработки фармакологической терапии болезни Альцгеймера.

4.4 Потенциальные терапевтические агенты на основе блокаторов TRPC6 каналов

Мутация PSEN1-M146V влияет на внутриклеточный кальциевый гомеостаз путем нарушения функции пресенилина 1 в качестве канала утечки Ca^{2+} из ЭПР [259], что вызывает повышение концентрации Ca^{2+} в ЭПР и компенсаторному подавлению STIM2-опосредованного нДУВКа [243]. Напротив, мутация PSEN1ΔE9 действует на пресенилин 1 усиливая функцию утечки Ca^{2+} из ЭПР [259], тем самым опустошая депо ЭПР и повышает активность нДУВК. В настоящей работе мы показали, что мутация PSEN1ΔE9 усиливает синаптический нДУВК (Рисунок 40) в соответствии с ранее опубликованными результатами на клетках Neuro2a [220]. Повышенный нДУВК в PSEN1ΔE9-трансфицированных нейронах зависел от экспрессии каналов TRPC6 (Рисунок 40) и блокировался соединением EVP4593 (Рисунок 41). EVP4593 является антагонистом нДУВК, который ранее был исследован на нейронах стриатума [274].

Процент грибовидных шипиков был снижен в нейронах экспрессирующих PSEN1ΔE9 (Рисунок 39). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что сверхнормальная активность нДУВК также приводит к дестабилизации грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа. Сигнальные пути связывающие активность нДУВК со стабильностью дендритных шипиков изучены плохо. Ранее было обнаружено, что фосфорилирование CaMKII подавляется в нейронах гиппокампа с мутацией PSEN1-M146V [243]. pCaMKII участвует в индукции ДВП и в литературе ее часто называют «молекулой памяти». Мы предполагаем, что сниженный нДУВК вызывает понижение экспрессии pCaMKII и сдвигает баланс в сторону CaN (Рисунок 4). Эти внутриклеточные события приводят к нарушению индукции ДВП и, следовательно, вызывают уменьшение количества грибовидных шипиков. Что касается мутации PSEN1ΔE9, то она напоминает случай с активацией нДУВК, который был ранее описан в мышинной модели болезни Хантингтона (БХ) [274]. Предполагается, что в БХ избыточный цитозольный Ca^{2+} может активировать кальпаины, а также Ca^{2+} может накапливаться в митохондриях, вызывая гибель дендритных шипиков [27]. Также возможно, что чрезмерный нДУВК вызывает чрезмерную активацию кальцинейрина. Инкубация нейронов экспрессирующих PSEN1ΔE9 с EVP4593 частично восстанавливала потерю грибовидных шипиков в PSEN1ΔE9-трансфицированных нейронах (Рисунок 42). Таким образом, ингибиторы нДУВК, такие как EVP4593, могут быть

использованы в качестве терапевтических средств для лечения пациентов с нБА с PSEN1ΔE9 мутацией, а также в случаях БА в которых наблюдается повышение активности нДУВК [258, 283]. Тем не менее, терапевтическое окно для EVP4593 соединения может быть ограничено, так как мы наблюдали тенденцию к уменьшению грибовидных шипиков в контрольных нейронах, обработанных EVP4593 (Рисунок 42).

В заключение, результаты диссертационной работы еще раз подчеркивают важность поддержания кальциевого гомеостаза в ЭПР нейронов для синаптической стабильности. Мутации PSEN1-M146V и PSEN1ΔE9 нБА имеют противоположные влияния на функцию пресенилина 1 в качестве канала утечки кальция из ЭПР, на уровень Ca^{2+} в ЭПР и синаптический нДУВК. Однако в обоих случаях в результате нарушения регуляции Ca^{2+} - зависимых сигнальных путей происходит потеря синаптических грибовидных шипиков. Мы показали, что активаторы нДУВК оказывают положительный эффект в контексте амилоидной токсичности, а ингибиторы нДУВК демонстрируют нейропротекторный эффект в контексте мутаций PSEN1ΔE9. Результаты диссертационной свидетельствуют о том, что выбор потенциального лечения БА может потребовать тщательного анализа основных причины заболевания для каждого отдельного пациента (Рисунок 43).

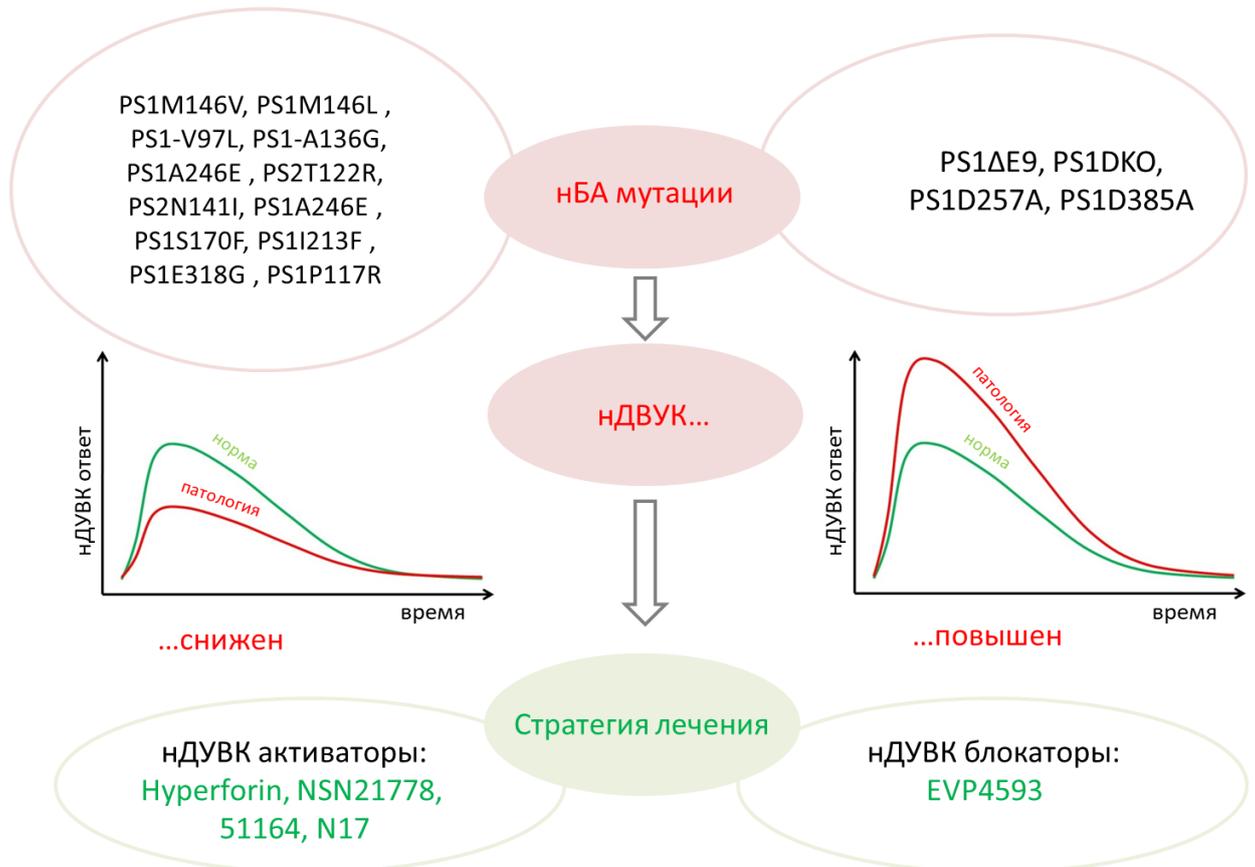


Рисунок 43 Нарушение регуляции нДУВК при БА. Различные нБА-ассоциированные мутации в белках пресенилинах могут привести к снижению [33, 98, 243, 258] или повышению [258, 283] в активности нДУВК. В зависимости от активности нДУВК в каждом конкретном

пациенте агонисты или антагонисты нДУВК могут быть использованы для коррекции кальциевого дисбаланса внутри синаптических шипиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксперименты, выполненные с использованием генетических и фармакологических моделей болезни Альцгеймера, позволили выделить в качестве перспективного для фармакологической регуляции основного патогенетического звена заболевания - нарушения формирования устойчивых синаптических контактов. Установлено физиологическое значение нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) для поддержания стабильных грибовидных дендритных шипиков в нейронах гиппокампа. Показано, что в условиях амилоидной токсичности нарушается регуляция кальциевого сигналинга, происходит потеря синаптических контактов, а положительная модуляция депо-управляемых каналов обеспечивает защиту нейронов гиппокампа.

Исходя из данных о регуляции депо-управляемого входа кальция каналом плазматической мембраны – каноническим каналом бго типа с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPC6), проведен поиск химических соединений, модулирующих TRPC6-нДУВК сигнальный путь. Установлено, что соединение N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид способно активировать TRPC6 каналы и проявляет при избытке кальция в ЭПР нейропротекторные свойства в концентрациях 10-100 нМ в опытах *in vitro*.

Соединение 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамин в опытах *in vitro* блокирует каналы TRPC6 в концентрациях 30нМ и проявляет нейропротекторные свойства при экспрессии мутантного белка PSEN1ΔE9 в нейронах гиппокампа.

Таким образом, охарактеризованы модуляторы TRPC6-нДУВК кальциевого каскада, агонисты и антагонисты, на основе которых возможна разработка лекарственных средств, направленных на фенотипы болезни Альцгеймера с кальциевой дисрегуляцией, ведущей как к истощению, так и избыточному накоплению кальция в ЭПР.

В качестве положительного модулятора TRPC6-зависимого сигнального пути нДУВК выявлено соединение бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата, доказана его способность в дозе 10 мг/ кг восстанавливать краткосрочную память при моделировании ишемии головного мозга у крыс.

Таким образом, определена новая фармакологическая мишень, перспективная для разработки оригинальных лекарственных средств лечения болезни Альцгеймера - TRPC6-зависимый нДУВК и охарактеризованы химические соединения, агонисты и антагонисты, тропные к данной мишени, которые могут быть рекомендованы в качестве базовых для последующих модификаций и фармакологической разработки.

ВЫВОДЫ

На основании результатов экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*, направленных на поиск новых фармакологических мишеней и химических структур, перспективных для разработки лекарственных средств лечения болезни Альцгеймера, сделаны следующие выводы:

1. Нарушения регуляции транспорта кальция депо-управляемыми кальциевыми каналами, как при гипо-, так и гиперактивации, ведут к снижению количества грибовидных шипиков в гиппокампе, что определяет целесообразность поиска как активаторов, так и ингибиторов нДУВК.
2. В условиях амилоидной токсичности снижается экспрессия трансмембранного белка ЭПР STIM2, что ведет к потере количества дендритных грибовидных шипиков, а увеличение продукции STIM2 – к их восстановлению.
3. На экспериментальной модели – мышах линии 5xFAD доказано, что активация депо-управляемых кальциевых каналов обеспечивает снижение числа амилоидных бляшек в коре головного мозга.
4. Установлена взаимосвязь гиперактивации TRPC6 – зависимого входа кальция в нейроны гиппокампа с дестабилизацией грибовидных шипиков при экспрессии мутантного белка PSEN1ΔE9.
5. Доказано, что при моделировании наследственных форм болезни Альцгеймера *in vitro* соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (N17), N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (51164) и 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамин (EVP4593), регулирующие TRPC6-зависимый депо-управляемый вход кальция в нейроны гиппокампа, обладают нейропротекторными свойствами.
6. На *in vitro* моделях болезни Альцгеймера с перенасыщенными кальцием внутриклеточными депо, при снижении активности TRPC6–зависимого депо-управляемого входа кальция в дендритные шипики, потерю синаптических контактов способны предотвратить соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата и N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид в концентрациях 100 нМ и 10-100 нМ соответственно.
7. На *in vitro* моделях болезни Альцгеймера при повышенной активности TRPC6–зависимого депо-управляемого входа кальция в дендритные шипики, потерю синаптических контактов способно предотвратить соединение 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиназолин-4,6-диамин в концентрации 30 нМ.

8. Соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата (N17), N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (51164) и 4-N-[2-(4-феноксифенил) этил] хиразолин-4,6-диамин (EVP4593) рекомендованы в качестве базовых структур для поиска и разработки средств регуляции новой фармакологической мишени лечения болезни Альцгеймера - TRPC6-зависимые деполуправляемые кальциевые каналы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленные соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата (N17) и N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (51164) – положительные регуляторы TRPC6-нДУВК в нейронах гиппокампа в *in vitro* условиях амилоидной синаптотоксичности могут быть рекомендованы для дальнейшей разработки на их основе средств фармакотерапии форм болезни Альцгеймера с избыточным содержанием кальция в эндоплазматическом ретикулуме.

2. Выявленное соединение 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамин (EVP4593) – отрицательный регулятор TRPC6-нДУВК может быть рекомендовано для дальнейшей разработки на его основе средства фармакотерапии формы болезни Альцгеймера, вызванной делецией 9го экзона в гене пресенилин 1.

3. Целесообразна разработка клинико-фармакологических подходов, направленных на выявление мутаций, специфичных для наследственных форм болезни Альцгеймера и диагностики фенотипа заболевания с истощением или перенасыщением кальцием эндоплазматического ретикулума.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АСМ – атомно-сканирующая микроскопия
- АФК – активные формы кислорода
- БА – болезнь Альцгеймера
- БХ – болезнь Хантингтона
- ДВД – долговременная депрессия
- ДВП – долговременная потенция
- ЛМН – Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации
- нБА – наследственная форма болезни Альцгеймера
- нДУВК – нейрональный депо-управляемый вход кальция
- Об/мин – оборотов в минуту
- пВПСП – полевой возбуждающий постсинаптический потенциал
- ПМ – плазматическая мембрана
- ПФА – параформальдегид
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПШПВ – полная ширина на полувысоте
- сБА – спорадическая форма болезни Альцгеймера
- СПХФУ – Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет
- у.е. – условные единицы
- ЭПР – эндоплазматический ретикулит
- $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация кальция
- 5xFAD (5 familiar Alzheimer's disease) – мышинная модель нБА, которая содержит три мутации в гене *APP* и две мутации в гене *PSEN1*.
- AAV1-mSTIM2 – аденоассоциированный вирус первого типа несущий ген мышинного белка STIM2
- AAV2 (Adeno-associated dependoparvovirus 2) – аденоассоциированный вирус второго типа
- ACSF (artificial cerebrospinal fluid) – искусственная спинномозговая жидкость
- Actin – актин
- ADDLs (A β 42-derived diffusible ligands) – диффундирующие A β 42-лиганды
- AMPA – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислота
- AMPA – рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
- ANOVA (Analysis of Variation) – дисперсионный анализ
- APP – amyloid precursor protein, белок предшественник бета-амилоида

APPKI (APP knock-in) – нокиновая линия мышей, у которой вырезан мышиный APP и вместо него вставлен мутантный человеческий APP

A β – бета-амилоид

A β 40 – бета-амилоид длиной 40 аминокислотных остатков

A β 42 – бета-амилоид длиной 42 аминокислотных остатка

BSA (Bovine Serum Albumin) – бычий сывороточный альбумин

Ca²⁺ – ион кальция

CaMKII – кальмодулин-зависимая протеинкиназа 2 типа

CaN – кальцинейрин

CHAPS – 3-[(3- Холаמידопропил)диметиламмоний-]-1-пропансульфонат

DAG – диацилглицерид

DIV (days in vitro) – время проведенное клетками в *in vitro* условиях в днях

DMSO – диметилсульфоксид

DTT – d-меркаптоэтанол

ECL (enhanced chemiluminescence) – набор реактивов, вызывающий усиление хемилюминесценции

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EGTA – этиленгликольтетрауксусная кислота

GFP (green fluorescent protein) – зелёный флуоресцентный белок

HPF – гиперфорин

HRP – пероксидаза хрена

InsP3R – рецептор инозитол трифосфата

InsP3R1 – InsP3-зависимый рецептор 1

MCU (mitochondrial Ca²⁺ uniporter) – унипортер митохондриального канала

mGluR5 – метаботропный глутаматный рецептор 5 типа

mtPTP (mitochondrial permeability-transition pore) – митохондриальная пора переходной проницаемости

NMDA – N-метил-D-аспартат

NMDAR – рецепторы, чувствительные к N-метил-D-аспартату

NR2B – сокращено от NMDAR2B (N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B), одна из субъединиц NMDA-рецептора

oAb – олигомерные формы бета-амилоида

OAG – 1-олеоил-2-ацетил-sn-глицерин

oA β – олигомерные формы амилоида бета

p – уровень статистической значимости

pAb – поликлональные антитела
 PBS (phosphate buffered saline) – натрий-фосфатный буфер
 pCaMKII – фосфорилированная кальмодулин-зависимая протеинкиназа 2 типа
 pH – водородный показатель
 PMSF – фенилметилсульфонил фторид
 PPZ – пиперазин
 PPZ1 – [4- (5-хлор-2-метилфенил) пиперазин-1-ил] (3-фторфенил) метанон)
 PPZ2 – 2- [4- (2,3-диметилфенил) пиперазин-1-ил] -N- (2-этоксифенил) ацетамид
 PS1-M146V-KI – линия мышей, в которой мышинный ген пресенилин 1 заменен на мутантный M146V ген пресенилина 1 человека
 PSA – персульфат аммония
 PSD95 – белок постсинаптической плотности 95
PSEN1 и *PSEN2* – гены, кодирующие белки пресенилин-1 (PS1) и пресенилин-2 (PS2).
*PSEN1*ΔE9 – мутантный пресенилин 1 с делетированным 9 экзоном
 PtdS – фосфатидилсерин.
 PVDF – поливинилиденфторид
 RyanR – рианодиновый рецептор
 SD (standard deviation) – стандартное отклонение
 SDS – додецилсульфат натрия
 SEM (standard error of the mean) – стандартная ошибка среднего
 SERCA – кальциевая АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулула
 STIM1 (stromal interacting molecule 1) – стромальная молекула взаимодействия 1
 STIM2 (stromal interaction molecule 2) – стромальная молекула взаимодействия 2
 TAE – трис-ацетатный буфер
 TBS (theta burst stimulation) – стимуляции тета-всплеска
 TBST – буфер, содержащий трис, SDS, NaCl и Tween
 TEMED – тетраметилэтилендиамин
 Thy1-GFP-M-line – линия мышей, в которой GFP-белок экспрессируется под контролем нейронального промотера Thy1
 Tris-HCl – трис(гидроксиметил)аминометан с добавлением соляной кислоты
 TRPC6 – канонический канал с транзиторным рецепторным потенциалом бго типа
 Tubulin – тубулин
 Tween – полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат
 VGCCs (voltage-gated calcium channels) – потенциал-зависимые кальциевые каналы
 WT – дикий тип

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оковитый С.В., Радько С.В., Е.Б. Шустов. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49, N 9. С. 3-7.
2. Пчицкая Е.И., Ерофеев А.И., Егорова П.А., Красковская Н.А., Попугаева Е.А., Волосников К.О., А.В. Большакова. Трансфекция первичных нейрональных культур // Биофизические и биохимические методы экспериментальной нейробиологии: современные представления. Ч.1: учебное пособие / под ред. И.Б. Безпрозванного О. Л. Власовой – СПб: Изд-во Политехн. ун-та, 2017. – С. 33-42.
3. Сысоев Ю.И., Попугаева Е.А., Чернюк Д.П., Титович И.А., Загладкина Е.В., Болотова В.Ц. [и др.] Механизм действия нового производного этаноламина - бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандионата // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2019. Т. 82, N 4. С. 3-10.
4. Титович И.А., Сысоев Ю.И., Болотова В.Ц., С.В. Оковитый. Нейротропная активность нового производного аминокетанола в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2017. Т. 80, N 5. С. 3-6.
5. Тювина Н.А., В.В. Балабанова. Деменции альцгеймеровского типа: современное состояние проблемы // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2014. N 1. С. 61-67.
6. Язуина Н.А., Комелева Ю.К., Салмина А.Б., Петрова М.М., Морозова Г.А., Н.А. Малиновская. Эпидемиология болезни Альцгеймера в мире // Неврологический журнал. 2012. Т. 17, N 5. С. 32-37.
7. Abbott A. C., Calderon Toledo C., Aranguiz F. C., Inestrosa N. C., Varela-Nallar L. Tetrahydroperforin increases adult hippocampal neurogenesis in wild-type and APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice // Journal of Alzheimers Disease. 2013. Т. 34, N 4. С. 873-885.
8. Abdallah C. G., Sanacora G., Duman R. S., Krystal J. H. Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics // Annu Rev Med. 2015. Т. 66. С. 509-523.
9. Ahmed M., Davis J., Aucoin D., Sato T., Ahuja S., Aimoto S. [et al.] Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils // Nat Struct Mol Biol. 2010. Т. 17, N 5. С. 561-567.
10. Alberdi E., Wyssenbach A., Alberdi M., Sanchez-Gomez M. V., Cavaliere F., Rodriguez J. J. [et al.] Ca(2+) -dependent endoplasmic reticulum stress correlates with astrogliosis in oligomeric amyloid beta-treated astrocytes and in a model of Alzheimer's disease // Aging Cell. 2013. Т. 12, N 2. С. 292-302.

11. Alkhani H., Ase A. R., Grant R., O'donnell D., Groschner K., Seguela P. Contribution of TRPC3 to store-operated calcium entry and inflammatory transductions in primary nociceptors // *Mol Pain*. 2014. T. 10. C. 43.
12. Anekonda T. S., Quinn J. F., Harris C., Frahler K., Wadsworth T. L., Woltjer R. L. L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease // *Neurobiol Dis*. 2011. T. 41, N 1. C. 62-70.
13. Arbel-Ornath M., Hudry E., Boivin J. R., Hashimoto T., Takeda S., Kuchibhotla K. V. [et al.] Soluble oligomeric amyloid-beta induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain // *Mol Neurodegener*. 2017. T. 12, N 1. C. 27.
14. Arimon M., Diez-Perez I., Kogan M. J., Durany N., Giralt E., Sanz F., Fernandez-Busquets X. Fine structure study of Abeta1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy // *FASEB J*. 2005. T. 19, N 10. C. 1344-1346.
15. Arispe N., Rojas E., Pollard H. B. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993. T. 90, N 2. C. 567-571.
16. Auffret A., Gautheron V., Mattson M. P., Mariani J., Rovira C. Progressive age-related impairment of the late long-term potentiation in Alzheimer's disease presenilin-1 mutant knock-in mice // *J Alzheimers Dis*. 2010. T. 19, N 3. C. 1021-1033.
17. Baba A., Yasui T., Fujisawa S., Yamada R. X., Yamada M. K., Nishiyama N. [et al.] Activity-evoked capacitative Ca²⁺ entry: implications in synaptic plasticity // *J Neurosci*. 2003. T. 23, N 21. C. 7737-7741.
18. Bai X. C., Yan C., Yang G., Lu P., Ma D., Sun L. [et al.] An atomic structure of human gamma-secretase // *Nature*. 2015. T. 525, N 7568. C. 212-217.
19. Balasuriya D., Srivats S., Murrell-Lagnado R. D., Edwardson J. M. Atomic force microscopy (AFM) imaging suggests that stromal interaction molecule 1 (STIM1) binds to Orai1 with sixfold symmetry // *FEBS Lett*. 2014. T. 588, N 17. C. 2874-2880.
20. Bandara S., Malmersjo S., Meyer T. Regulators of calcium homeostasis identified by inference of kinetic model parameters from live single cells perturbed by siRNA // *Sci Signal*. 2013. T. 6, N 283. C. ra56.
21. Bartus R. T., Dean R. L., 3rd, Beer B., Lippa A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction // *Science*. 1982. T. 217, N 4558. C. 408-414.
22. Bergmans B. A., De Strooper B. gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies // *Lancet Neurol*. 2010. T. 9, N 2. C. 215-226.
23. Berlau D. J., Corrada M. M., Head E., Kawas C. H. APOE epsilon2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old // *Neurology*. 2009. T. 72, N 9. C. 829-834.

24. Berman R. M., Cappiello A., Anand A., Oren D. A., Heninger G. R., Charney D. S., Krystal J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients // *Biol Psychiatry*. 2000. T. 47, N 4. C. 351-354.
25. Berna-Erro A., Braun A., Kraft R., Kleinschnitz C., Schuhmann M. K., Stegner D. [et al.] STIM2 regulates capacitive Ca^{2+} entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death // *Sci Signal*. 2009. T. 2, N 93. C. ra67.
26. Berridge M. J. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease // *Pflugers Arch*. 2009.
27. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases // *Trends Mol Med*. 2009. T. 15, N 3. C. 89-100.
28. Bezprozvanny I. Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pathogenesis of Huntington's disease and spinocerebellar ataxias // *Neurochem Res*. 2011. T. 36, N 7. C. 1186-1197.
29. Bezprozvanny I., Hiesinger P. R. The synaptic maintenance problem: membrane recycling, Ca^{2+} homeostasis and late onset degeneration // *Mol Neurodegener*. 2013. T. 8. C. 23.
30. Bezprozvanny I., Mattson M. P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Trends Neurosci*. 2008. T. 31, N 9. C. 454-463.
31. Bliss T. V., Collingridge G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus // *Nature*. 1993. T. 361, N 6407. C. 31-39.
32. Bloodgood B. L., Sabatini B. L. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines // *Science*. 2005. T. 310, N 5749. C. 866-869.
33. Bojarski L., Pomorski P., Szybinska A., Drab M., Skibinska-Kijek A., Gruszczynska-Biegala J., Kuznicki J. Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitive Ca^{2+} entry in familial Alzheimer's disease // *Biochim Biophys Acta*. 2009. T. 1793, N 6. C. 1050-1057.
34. Bon R. S., Beech D. J. In pursuit of small molecule chemistry for calcium-permeable non-selective TRPC channels -- mirage or pot of gold? // *Br J Pharmacol*. 2013. T. 170, N 3. C. 459-474.
35. Borlikova G. G., Trejo M., Mably A. J., Mc Donald J. M., Sala Frigerio C., Regan C. M. [et al.] Alzheimer brain-derived amyloid beta-protein impairs synaptic remodeling and memory consolidation // *Neurobiol Aging*. 2013. T. 34, N 5. C. 1315-1327.
36. Bourne J., Harris K. M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? // *Curr Opin Neurobiol*. 2007. T. 17, N 3. C. 381-386.
37. Brandman O., Liou J., Park W. S., Meyer T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels // *Cell*. 2007. T. 131, N 7. C. 1327-1339.
38. Briggs C. A., Chakroborty S., Stutzmann G. E. Emerging pathways driving early synaptic pathology in Alzheimer's disease // *Biochem Biophys Res Commun*. 2017. T. 483, N 4. C. 988-997.

39. Burgdorf J., Zhang X. L., Weiss C., Gross A., Boikess S. R., Kroes R. A. [et al.] The long-lasting antidepressant effects of rapastinel (GLYX-13) are associated with a metaplasticity process in the medial prefrontal cortex and hippocampus // *Neuroscience*. 2015. T. 308. C. 202-211.
40. Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. // *Alzheimers Dement*. 2017. T. 13, N 2. C. 178-182 e117.
41. Castellano J. M., Kim J., Stewart F. R., Jiang H., Demattos R. B., Patterson B. W. [et al.] Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance // *Sci Transl Med*. 2011. T. 3, N 89. C. 89ra57.
42. Catarzi D., Colotta V., Varano F. Competitive Gly/NMDA receptor antagonists // *Curr Top Med Chem*. 2006. T. 6, N 8. C. 809-821.
43. Cavieres V. A., Gonzalez A., Munoz V. C., Yefi C. P., Bustamante H. A., Barraza R. R. [et al.] Tetrahydroperforin Inhibits the Proteolytic Processing of Amyloid Precursor Protein and Enhances Its Degradation by Atg5-Dependent Autophagy // *PLoS One*. 2015. T. 10, N 8. C. e0136313.
44. Cerpa W., Hancke J. L., Morazzoni P., Bombardelli E., Riva A., Marin P. P., Inestrosa N. C. The hyperforin derivative IDN5706 occludes spatial memory impairments and neuropathological changes in a double transgenic Alzheimer's mouse model // *Curr Alzheimer Res*. 2010. T. 7, N 2. C. 126-133.
45. Chakroborty S., Briggs C., Miller M. B., Goussakov I., Schneider C., Kim J. [et al.] Stabilizing ER Ca²⁺ channel function as an early preventative strategy for Alzheimer's disease // *PLoS One*. 2012. T. 7, N 12. C. e52056.
46. Chakroborty S., Goussakov I., Miller M. B., Stutzmann G. E. Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice // *J Neurosci*. 2009. T. 29, N 30. C. 9458-9470.
47. Chakroborty S., Kim J., Schneider C., Jacobson C., Molgo J., Stutzmann G. E. Early presynaptic and postsynaptic calcium signaling abnormalities mask underlying synaptic depression in presymptomatic Alzheimer's disease mice // *J Neurosci*. 2012. T. 32, N 24. C. 8341-8353.
48. Chakroborty S., Stutzmann G. E. Calcium channelopathies and Alzheimer's disease: Insight into therapeutic success and failures // *Eur J Pharmacol*. 2013.
49. Chan S. L., Mayne M., Holden C. P., Geiger J. D., Mattson M. P. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons // *J Biol Chem*. 2000. T. 275, N 24. C. 18195-18200.
50. Chen H. S., Lipton S. A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists // *J Neurochem*. 2006. T. 97, N 6. C. 1611-1626.
51. Cheng K. T., Ong H. L., Liu X., Ambudkar I. S. Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca(2+) entry activated by store depletion // *Adv Exp Med Biol*. 2011. T. 704. C. 435-449.

52. Cheung K. H., Mei L., Mak D. O., Hayashi I., Iwatsubo T., Kang D. E., Foskett J. K. Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons // *Sci Signal*. 2010. T. 3, N 114. C. ra22.
53. Cheung K. H., Shineman D., Muller M., Cardenas C., Mei L., Yang J. [et al.] Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating // *Neuron*. 2008. T. 58, N 6. C. 871-883.
54. Choi D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity // *J Neurosci*. 1987. T. 7, N 2. C. 369-379.
55. Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W. [et al.] Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families // *Science*. 1993. T. 261, N 5123. C. 921-923.
56. Cummings J., Aisen P. S., Dubois B., Frolich L., Jack C. R., Jr., Jones R. W. [et al.] Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025 // *Alzheimers Res Ther*. 2016. T. 8. C. 39.
57. Dahlgren K. N., Manelli A. M., Stine W. B., Jr., Baker L. K., Krafft G. A., Ladu M. J. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability // *J Biol Chem*. 2002. T. 277, N 35. C. 32046-32053.
58. Danysz W., Parsons C. G. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections // *Br J Pharmacol*. 2012. T. 167, N 2. C. 324-352.
59. Darbellay B., Arnaudeau S., Ceroni D., Bader C. R., Konig S., Bernheim L. Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2 // *J Biol Chem*. 2010. T. 285, N 29. C. 22437-22447.
60. De Felice F. G., Velasco P. T., Lambert M. P., Viola K., Fernandez S. J., Ferreira S. T., Klein W. L. Aβ oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine // *J Biol Chem*. 2007. T. 282, N 15. C. 11590-11601.
61. De Strooper B. Lessons from a failed gamma-secretase Alzheimer trial // *Cell*. 2014. T. 159, N 4. C. 721-726.
62. Decker H., Jurgensen S., Adrover M. F., Brito-Moreira J., Bomfim T. R., Klein W. L. [et al.] N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid-beta peptide oligomers // *J Neurochem*. 2010. T. 115, N 6. C. 1520-1529.
63. Dekosky S. T., Scheff S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity // *Ann Neurol*. 1990. T. 27, N 5. C. 457-464.
64. Del Prete Dolores, Checler Frédéric, Chami Mounia. Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease // *Molecular Neurodegeneration*. 2014. T. 9. C. 21-21.

65. Demuro A., Mina E., Kayed R., Milton S. C., Parker I., Glabe C. G. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers // *J Biol Chem*. 2005. T. 280, N 17. C. 17294-17300.
66. Demuro A., Parker I. Cytotoxicity of intracellular abeta42 amyloid oligomers involves Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum by stimulated production of inositol trisphosphate // *J Neurosci*. 2013. T. 33, N 9. C. 3824-3833.
67. Demuro A., Parker I., Stutzmann G. E. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease // *J Biol Chem*. 2010. T. 285, N 17. C. 12463-12468.
68. Derkach V. A., Oh M. C., Guire E. S., Soderling T. R. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity // *Nat Rev Neurosci*. 2007. T. 8, N 2. C. 101-113.
69. Deshpande A., Mina E., Glabe C., Busciglio J. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons // *J Neurosci*. 2006. T. 26, N 22. C. 6011-6018.
70. Di Carlo G., Borrelli F., Ernst E., Izzo A. A. St John's wort: Prozac from the plant kingdom // *Trends Pharmacol Sci*. 2001. T. 22, N 6. C. 292-297.
71. Dietrich A., Gudermann T. TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance // *Handb Exp Pharmacol*. 2014. T. 222. C. 157-188.
72. Dinamarca M. C., Cerpa W., Garrido J., Hancke J. L., Inestrosa N. C. Hyperforin prevents beta-amyloid neurotoxicity and spatial memory impairments by disaggregation of Alzheimer's amyloid-beta-deposits // *Mol Psychiatry*. 2006. T. 11, N 11. C. 1032-1048.
73. Diver J. M., Sage S. O., Rosado J. A. The inositol trisphosphate receptor antagonist 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) blocks Ca²⁺ entry channels in human platelets: cautions for its use in studying Ca²⁺ influx // *Cell Calcium*. 2001. T. 30, N 5. C. 323-329.
74. Drummond E., Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality // *Acta Neuropathol*. 2017. T. 133, N 2. C. 155-175.
75. Duara R., Lopez-Alberola R. F., Barker W. W., Loewenstein D. A., Zatzinsky M., Eisdorfer C. E., Weinberg G. B. A comparison of familial and sporadic Alzheimer's disease // *Neurology*. 1993. T. 43, N 7. C. 1377-1384.
76. Duman R. S., Aghajanian G. K., Sanacora G., Krystal J. H. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants // *Nat Med*. 2016. T. 22, N 3. C. 238-249.
77. Engert F., Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity // *Nature*. 1999. T. 399, N 6731. C. 66-70.
78. Estacion M., Li S., Sinkins W. G., Gosling M., Bahra P., Poll C. [et al.] Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation // *J Biol Chem*. 2004. T. 279, N 21. C. 22047-22056.

79. Feng G., Mellor R. H., Bernstein M., Keller-Peck C., Nguyen Q. T., Wallace M. [et al.] Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP // *Neuron*. 2000. T. 28, N 1. C. 41-51.
80. Ferreira I. L., Bajouco L. M., Mota S. I., Auberson Y. P., Oliveira C. R., Rego A. C. Amyloid beta peptide 1-42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in cortical cultures // *Cell Calcium*. 2012. T. 51, N 2. C. 95-106.
81. Ferreira S. T., Klein W. L. The Aβ oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease // *Neurobiol Learn Mem*. 2011. T. 96, N 4. C. 529-543.
82. Ferreiro E., Oliveira C. R., Pereira C. Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide // *J Neurosci Res*. 2004. T. 76.
83. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskii D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014. T. 50, N 3. C. 444-457.
84. Forabosco P., Ramasamy A., Trabzuni D., Walker R., Smith C., Bras J. [et al.] Insights into TREM2 biology by network analysis of human brain gene expression data // *Neurobiol Aging*. 2013. T. 34, N 12. C. 2699-2714.
85. Forette F., Seux M. L., Staessen J. A., Thijs L., Babarskiene M. R., Babeanu S. [et al.] The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study // *Arch Intern Med*. 2002. T. 162, N 18. C. 2046-2052.
86. Foster T. C., Kyritsopoulos C., Kumar A. Central role for NMDA receptors in redox mediated impairment of synaptic function during aging and Alzheimer's disease // *Behav Brain Res*. 2017. T. 322, N Pt B. C. 223-232.
87. Foster T. C., Sharrow K. M., Masse J. R., Norris C. M., Kumar A. Calcineurin links Ca²⁺ dysregulation with brain aging // *J Neurosci*. 2001. T. 21, N 11. C. 4066-4073.
88. Freeman J. J., Jenden D. J. The source of choline for acetylcholine synthesis in brain // *Life Sci*. 1976. T. 19, N 7. C. 949-961.
89. Gafni J., Munsch J. A., Lam T. H., Catlin M. C., Costa L. G., Molinski T. F., Pessah I. N. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor // *Neuron*. 1997. T. 19, N 3. C. 723-733.
90. Gandy S., Simon A. J., Steele J. W., Lublin A. L., Lah J. J., Walker L. C. [et al.] Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid-beta oligomers // *Ann Neurol*. 2010. T. 68, N 2. C. 220-230.

91. Garcia-Alvarez G., Lu B., Yap K. A., Wong L. C., Thevathasan J. V., Lim L. [et al.] STIM2 regulates PKA-dependent phosphorylation and trafficking of AMPARs // *Mol Biol Cell*. 2015. T. 26, N 6. C. 1141-1159.
92. Garcia-Alvarez G., Shetty M. S., Lu B., Yap K. A., Oh-Hora M., Sajikumar S. [et al.] Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes // *Front Behav Neurosci*. 2015. T. 9. C. 180.
93. Gavello D., Calorio C., Franchino C., Cesano F., Carabelli V., Carbone E., Marcantoni A. Early Alterations of Hippocampal Neuronal Firing Induced by Abeta42 // *Cereb Cortex*. 2016.
94. Gibon J., Deloulme J. C., Chevallier T., Ladeveze E., Abrous D. N., Bouron A. The antidepressant hyperforin increases the phosphorylation of CREB and the expression of TrkB in a tissue-specific manner // *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013. T. 16, N 1. C. 189-198.
95. Goussakov I., Miller M. B., Stutzmann G. E. NMDA-mediated Ca(2+) influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice // *J Neurosci*. 2010. T. 30, N 36. C. 12128-12137.
96. Green K. N., Demuro A., Akbari Y., Hitt B. D., Smith I. F., Parker I., Laferla F. M. SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production // *J Cell Biol*. 2008. T. 181, N 7. C. 1107-1116.
97. Gregory R. B., Rychkov G., Barritt G. J. Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca²⁺ channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors // *Biochem J*. 2001. T. 354, N Pt 2. C. 285-290.
98. Greotti E., Capitanio P., Wong A., Pozzan T., Pizzo P., Pendin D. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants and intracellular Ca(2+) handling: A single-organelle, FRET-based analysis // *Cell Calcium*. 2019. T. 79. C. 44-56.
99. Gruszczynska-Biegala J., Kuznicki J. Native STIM2 and ORAI1 proteins form a calcium-sensitive and thapsigargin-insensitive complex in cortical neurons // *J Neurochem*. 2013. T. 126, N 6. C. 727-738.
100. Gruszczynska-Biegala Joanna, Pomorski Pawel, Wisniewska Marta B., Kuznicki Jacek. Differential Roles for STIM1 and STIM2 in Store-Operated Calcium Entry in Rat Neurons // *PloS one*. 2011. T. 6, N 4. C. e19285.
101. Gu Z., Liu W., Yan Z. {beta}-Amyloid impairs AMPA receptor trafficking and function by reducing Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II synaptic distribution // *J Biol Chem*. 2009. T. 284, N 16. C. 10639-10649.
102. Haass C., Selkoe D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. T. 8, N 2. C. 101-112.
103. Hardingham G. E., Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders // *Nat Rev Neurosci*. 2010. T. 11, N 10. C. 682-696.

104. Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal // *J Neurochem*. 2009. T. 110, N 4. C. 1129-1134.
105. Hardy J. A., Higgins G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis // *Science*. 1992. T. 256, N 5054. C. 184-185.
106. Hardy J., Selkoe D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // *Science*. 2002. T. 297, N 5580. C. 353-356.
107. Harkany T., Abraham I., Timmerman W., Laskay G., Toth B., Sasvari M. [et al.] beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis // *Eur J Neurosci*. 2000. T. 12, N 8. C. 2735-2745.
108. Harris K. M., Jensen F. E., Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation // *J Neurosci*. 1992. T. 12, N 7. C. 2685-2705.
109. Hayrapetyan V., Rybalchenko V., Rybalchenko N., Koulen P. The N-terminus of presenilin-2 increases single channel activity of brain ryanodine receptors through direct protein-protein interaction // *Cell Calcium*. 2008. T. 44, N 5. C. 507-518.
110. He J., Yu T., Pan J., Li H. Visualisation and identification of the interaction between STIM1s in resting cells // *PLoS One*. 2012. T. 7, N 3. C. e33377.
111. Heiser J. H., Schuwald A. M., Sillani G., Ye L., Muller W. E., Leuner K. TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling // *J Neurochem*. 2013. T. 127, N 3. C. 303-313.
112. Hermann D., Mezler M., Muller M. K., Wicke K., Gross G., Draguhn A. [et al.] Synthetic A β oligomers (A β (1-42) globulomer) modulate presynaptic calcium currents: prevention of A β -induced synaptic deficits by calcium channel blockers // *Eur J Pharmacol*. 2013. T. 702, N 1-3. C. 44-55.
113. Herms J., Schneider I., Dewachter I., Caluwaerts N., Kretzschmar H., Van Leuven F. Capacitive calcium entry is directly attenuated by mutant presenilin-1, independent of the expression of the amyloid precursor protein // *J Biol Chem*. 2003. T. 278, N 4. C. 2484-2489.
114. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis // *Nat Neurosci*. 2015. T. 18, N 6. C. 794-799.
115. Hofmann T., Obukhov A. G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T., Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol // *Nature*. 1999. T. 397, N 6716. C. 259-263.
116. Honig L. S., Vellas B., Woodward M., Boada M., Bullock R., Borrie M. [et al.] Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease // *N Engl J Med*. 2018. T. 378, N 4. C. 321-330.

117. Hoover P. J., Lewis R. S. Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1) // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. T. 108, N 32. C. 13299-13304.
118. Inestrosa N. C., Tapia-Rojas C., Griffith T. N., Carvajal F. J., Benito M. J., Rivera-Dictter A. [et al.] Tetrahydroperforin prevents cognitive deficit, Abeta deposition, tau phosphorylation and synaptotoxicity in the APP_{swe}/PSEN1 Δ E9 model of Alzheimer's disease: a possible effect on APP processing // *Transl Psychiatry*. 2011. T. 1. C. e20.
119. Jansen W. J., Ossenkoppele R., Knol D. L., Tijms B. M., Scheltens P., Verhey F. R. [et al.] Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis // *JAMA*. 2015. T. 313, N 19. C. 1924-1938.
120. Jay T. R., Miller C. M., Cheng P. J., Graham L. C., Bemiller S., Broihier M. L. [et al.] TREM2 deficiency eliminates TREM²⁺ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models // *J Exp Med*. 2015. T. 212, N 3. C. 287-295.
121. Jelic V., Kivipelto M., Winblad B. Clinical trials in mild cognitive impairment: lessons for the future // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006. T. 77, N 4. C. 429-438.
122. Jensen L. E., Bultynck G., Luyten T., Amijee H., Bootman M. D., Roderick H. L. Alzheimer's disease-associated peptide Abeta42 mobilizes ER Ca^{2+} via InsP3R-dependent and -independent mechanisms // *Front Mol Neurosci*. 2013. T. 6. C. 36.
123. Ji L., Zhao X., Lu W., Zhang Q., Hua Z. Intracellular Abeta and its Pathological Role in Alzheimer's Disease: Lessons from Cellular to Animal Models // *Curr Alzheimer Res*. 2016. T. 13, N 6. C. 621-630.
124. Jiang M., Chen G. High Ca^{2+} -phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures // *Nat Protoc*. 2006. T. 1, N 2. C. 695-700.
125. Jouvenceau A., Dutar P. A role for the protein phosphatase 2B in altered hippocampal synaptic plasticity in the aged rat // *J Physiol Paris*. 2006. T. 99, N 2-3. C. 154-161.
126. Kaja S., Sumien N., Shah V. V., Puthawala I., Maynard A. N., Khullar N. [et al.] Loss of Spatial Memory, Learning, and Motor Function During Normal Aging Is Accompanied by Changes in Brain Presenilin 1 and 2 Expression Levels // *Mol Neurobiol*. 2015. T. 52, N 1. C. 545-554.
127. Karch C. M., Cruchaga C., Goate A. M. Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic // *Neuron*. 2014. T. 83, N 1. C. 11-26.
128. Karran E., De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? // *J Neurochem*. 2016. T. 139 Suppl 2. C. 237-252.
129. Kasai H., Fukuda M., Watanabe S., Hayashi-Takagi A., Noguchi J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition // *Trends Neurosci*. 2010. T. 33, N 3. C. 121-129.

130. Kastanenka K. V., Bussiere T., Shakerdge N., Qian F., Weinreb P. H., Rhodes K., Bacskai B. J. Immunotherapy with Aducanumab Restores Calcium Homeostasis in Tg2576 Mice // *J Neurosci*. 2016. T. 36, N 50. C. 12549-12558.
131. Kennedy M. B., Beale H. C., Carlisle H. J., Washburn L. R. Integration of biochemical signalling in spines // *Nat Rev Neurosci*. 2005. T. 6, N 6. C. 423-434.
132. Kennedy M. J., Ehlers M. D. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity // *Annu Rev Neurosci*. 2006. T. 29. C. 325-362.
133. Kersten B. P., Mclaughlin M. E. Toxicology and management of novel psychoactive drugs // *J Pharm Pract*. 2015. T. 28, N 1. C. 50-65.
134. Khachaturian Z. S. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain // *Neurobiol Aging*. 1987. T. 8, N 4. C. 345-346.
135. Kim J., Basak J. M., Holtzman D. M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease // *Neuron*. 2009. T. 63, N 3. C. 287-303.
136. Kimura R., Ohno M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model // *Neurobiol Dis*. 2009. T. 33, N 2. C. 229-235.
137. Klejman M. E., Gruszczynska-Biegala J., Skibinska-Kijek A., Wisniewska M. B., Misztal K., Blazejczyk M. [et al.] Expression of STIM1 in brain and puncta-like co-localization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca(2+) store in neurons // *Neurochem Int*. 2009. T. 54, N 1. C. 49-55.
138. Knappenberger K. S., Tian G., Ye X., Sobotka-Briner C., Ghanekar S. V., Greenberg B. D., Scott C. W. Mechanism of gamma-secretase cleavage activation: is gamma-secretase regulated through autoinhibition involving the presenilin-1 exon 9 loop? // *Biochemistry*. 2004. T. 43, N 20. C. 6208-6218.
139. Koch E. D., Olivera B. M., Terlau H., Conti F. The binding of kappa-Conotoxin PVIIA and fast C-type inactivation of Shaker K⁺ channels are mutually exclusive // *Biophys J*. 2004. T. 86, N 1 Pt 1. C. 191-209.
140. Koffie R. M., Hyman B. T., Spires-Jones T. L. Alzheimer's disease: synapses gone cold // *Mol Neurodegener*. 2011. T. 6, N 1. C. 63.
141. Koizumi Jin-Ichi, Yoshida Yoji, Nakazawa Teiji, Ooneda Genju. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. // *Jpn J Stroke*. 1986. T. 8, N 1. C. 1-8.
142. Korkotian E., Oni-Biton E., Segal M. The role of the store-operated calcium entry channel Orail in cultured rat hippocampal synapse formation and plasticity // *J Physiol*. 2017. T. 595, N 1. C. 125-140.
143. Kosik K. S., Joachim C. L., Selkoe D. J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986. T. 83, N 11. C. 4044-4048.

144. Kuchibhotla K. V., Goldman S. T., Lattarulo C. R., Wu H. Y., Hyman B. T., Bacskai B. J. Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks // *Neuron*. 2008. T. 59, N 2. C. 214-225.
145. Kurashov E. A., Fedorova E. V., Krylova J. V., Mitrukova G. G. Assessment of the Potential Biological Activity of Low Molecular Weight Metabolites of Freshwater Macrophytes with QSAR // *Scientifica (Cairo)*. 2016. T. 2016. C. 1205680.
146. Kushnir A., Marks A. R. Ryanodine receptor patents // *Recent Pat Biotechnol*. 2012. T. 6, N 3. C. 157-166.
147. Kyung T., Lee S., Kim J. E., Cho T., Park H., Jeong Y. M. [et al.] Optogenetic control of endogenous Ca(2+) channels in vivo // *Nat Biotechnol*. 2015. T. 33, N 10. C. 1092-1096.
148. Lacampagne A., Liu X., Reiken S., Bussiere R., Meli A. C., Lauritzen I. [et al.] Post-translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits // *Acta Neuropathol*. 2017. T. 134, N 5. C. 749-767.
149. Lacor P. N., Buniel M. C., Furlow P. W., Clemente A. S., Velasco P. T., Wood M. [et al.] Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease // *J Neurosci*. 2007. T. 27, N 4. C. 796-807.
150. Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A., Edwards C., Freed R., Liosatos M. [et al.] Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. T. 95, N 11. C. 6448-6453.
151. Lehnart S. E., Mongillo M., Bellinger A., Lindegger N., Chen B. X., Hsueh W. [et al.] Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice // *J Clin Invest*. 2008. T. 118, N 6. C. 2230-2245.
152. Leissring M. A., Akbari Y., Fanger C. M., Cahalan M. D., Mattson M. P., Laferla F. M. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice // *J Cell Biol*. 2000. T. 149, N 4. C. 793-798.
153. Leissring M. A., Murphy M. P., Mead T. R., Akbari Y., Sugarman M. C., Jannatipour M. [et al.] A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. T. 99, N 7. C. 4697-4702.
154. Lessard C. B., Lussier M. P., Cayouette S., Bourque G., Boulay G. The overexpression of presenilin2 and Alzheimer's-disease-linked presenilin2 variants influences TRPC6-enhanced Ca²⁺ entry into HEK293 cells // *Cell Signal*. 2005. T. 17, N 4. C. 437-445.
155. Leuner K., Heiser J. H., Derksen S., Mladenov M. I., Fehske C. J., Schubert R. [et al.] Simple 2,4-diacylphloroglucinols as classic transient receptor potential-6 activators--identification of a novel pharmacophore // *Mol Pharmacol*. 2010. T. 77, N 3. C. 368-377.

156. Leuner K., Kazanski V., Muller M., Essin K., Henke B., Gollasch M. [et al.] Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels // *FASEB J.* 2007. T. 21, N 14. C. 4101-4111.
157. Levere T. E., Walker A. Old age and cognition: enhancement of recent memory in aged rats by the calcium channel blocker nimodipine // *Neurobiol Aging.* 1992. T. 13, N 1. C. 63-66.
158. Li X., Dang S., Yan C., Gong X., Wang J., Shi Y. Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease // *Nature.* 2013. T. 493, N 7430. C. 56-61.
159. Li Z., Liu L., Deng Y., Ji W., Du W., Xu P. [et al.] Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits // *Cell Res.* 2011. T. 21, N 2. C. 305-315.
160. Liao Y., Erxleben C., Yildirim E., Abramowitz J., Armstrong D. L., Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. T. 104, N 11. C. 4682-4687.
161. Linde C. I., Baryshnikov S. G., Mazzocco-Spezia A., Golovina V. A. Dysregulation of Ca^{2+} signaling in astrocytes from mice lacking amyloid precursor protein // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011. T. 300, N 6. C. C1502-1512.
162. Liou J., Kim M. L., Heo W. D., Jones J. T., Myers J. W., Ferrell J. E., Jr., Meyer T. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx // *Curr Biol.* 2005. T. 15, N 13. C. 1235-1241.
163. Lippa C. F., Saunders A. M., Smith T. W., Swearer J. M., Drachman D. A., Ghetti B. [et al.] Familial and sporadic Alzheimer's disease: neuropathology cannot exclude a final common pathway // *Neurology.* 1996. T. 46, N 2. C. 406-412.
164. Lisman J., Raghavachari S. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses // *Sci STKE.* 2006. T. 2006, N 356. C. re11.
165. Lleo A., Blesa R., Gendre J., Castellvi M., Pastor P., Queralt R., Oliva R. A novel presenilin 2 gene mutation (D439A) in a patient with early-onset Alzheimer's disease // *Neurology.* 2001. T. 57, N 10. C. 1926-1928.
166. Lopez J. R., Lyckman A., Oddo S., Laferla F. M., Querfurth H. W., Shtifman A. Increased intraneuronal resting $[Ca^{2+}]$ in adult Alzheimer's disease mice // *J Neurochem.* 2008. T. 105, N 1. C. 262-271.
167. Lu R., Wang J., Tao R., Zhu T., Guo W., Sun Y. [et al.] Reduced TRPC6 mRNA levels in the blood cells of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment // *Mol Psychiatry.* 2018. T. 23, N 3. C. 767-776.
168. Majewski L., Maciag F., Boguszewski P. M., Wasilewska I., Wiera G., Wojtowicz T. [et al.] Overexpression of STIM1 in neurons in mouse brain improves contextual learning and impairs long-term depression // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017. T. 1864, N 6. C. 1071-1087.

169. Mak D. O., Cheung K. H., Toglia P., Foskett J. K., Ullah G. Analyzing and Quantifying the Gain-of-Function Enhancement of IP3 Receptor Gating by Familial Alzheimer's Disease-Causing Mutants in Presenilins // *PLoS Comput Biol.* 2015. T. 11, N 10. C. e1004529.
170. Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G. C., Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines // *Nature.* 2004. T. 429, N 6993. C. 761-766.
171. Mattson M. P. ER calcium and Alzheimer's disease: in a state of flux // *Sci Signal.* 2010. T. 3, N 114. C. pe10.
172. Mattson M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease // *Nature.* 2004. T. 430, N 7000. C. 631-639.
173. Mattson M. P., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I., Rydel R. E. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity // *J Neurosci.* 1992. T. 12, N 2. C. 376-389.
174. Mattson M. P., Zhu H., Yu J., Kindy M. S. Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia in vivo and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis // *J Neurosci.* 2000. T. 20, N 4. C. 1358-1364.
175. Mishizen-Eberz A. J., Rissman R. A., Carter T. L., Ikonovic M. D., Wolfe B. B., Armstrong D. M. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology // *Neurobiol Dis.* 2004. T. 15, N 1. C. 80-92.
176. Morris G. P., Clark I. A., Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease // *Acta Neuropathol Commun.* 2014. T. 2. C. 135.
177. Moskal J. R., Burgdorf J. S., Stanton P. K., Kroes R. A., Disterhoft J. F., Burch R. M., Khan M. A. The Development of Rapastinel (Formerly GLYX-13); A Rapid Acting and Long Lasting Antidepressant // *Curr Neuropharmacol.* 2017. T. 15, N 1. C. 47-56.
178. Moskal J. R., Kuo A. G., Weiss C., Wood P. L., O'connor Hanson A., Kelso S. [et al.] GLYX-13: a monoclonal antibody-derived peptide that acts as an N-methyl-D-aspartate receptor modulator // *Neuropharmacology.* 2005. T. 49, N 7. C. 1077-1087.
179. Mota S. I., Ferreira I. L., Rego A. C. Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease - A focus on NMDA receptors // *Neuropharmacology.* 2014. T. 76 Pt A. C. 16-26.
180. Mucke L., Selkoe D. J. Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012. T. 2, N 7. C. a006338.
181. Muir K. W. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists // *Curr Opin Pharmacol.* 2006. T. 6, N 1. C. 53-60.

182. Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B., Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid // *Nat Genet.* 1992. T. 1, N 5. C. 345-347.
183. Murrrough J. W., Perez A. M., Pillemer S., Stern J., Parides M. K., Aan Het Rot M. [et al.] Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression // *Biol Psychiatry.* 2013. T. 74, N 4. C. 250-256.
184. Nayak S., Herzog R. W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors // *Gene Ther.* 2010. T. 17, N 3. C. 295-304.
185. Nedergaard M., Verkhratsky A. Calcium dyshomeostasis and pathological calcium signalling in neurological diseases // *Cell Calcium.* 2010. T. 47, N 2. C. 101-102.
186. Nelson O., Supnet C., Liu H., Bezprozvanny I. Familial Alzheimer's disease mutations in presenilins: effects on endoplasmic reticulum calcium homeostasis and correlation with clinical phenotypes // *J Alzheimers Dis.* 2010. T. 21, N 3. C. 781-793.
187. Nelson O., Supnet C., Tolia A., Horre K., De Strooper B., Bezprozvanny I. Mutagenesis mapping of the presenilin 1 calcium leak conductance pore // *J Biol Chem.* 2011. T. 286, N 25. C. 22339-22347.
188. Nelson O., Tu H., Lei T., Bentahir M., De Strooper B., Bezprozvanny I. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1 // *J Clin Invest.* 2007. T. 117, N 5. C. 1230-1239.
189. Neuner S. M., Wilmott L. A., Hope K. A., Hoffmann B., Chong J. A., Abramowitz J. [et al.] TRPC3 channels critically regulate hippocampal excitability and contextual fear memory // *Behav Brain Res.* 2015. T. 281. C. 69-77.
190. Ng A. N., Krogh M., Toresson H. Dendritic EGFP-STIM1 activation after type I metabotropic glutamate and muscarinic acetylcholine receptor stimulation in hippocampal neuron // *J Neurosci Res.* 2011. T. 89, N 8. C. 1235-1244.
191. Nimmrich V., Grimm C., Draguhn A., Barghorn S., Lehmann A., Schoemaker H. [et al.] Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents // *J Neurosci.* 2008. T. 28, N 4. C. 788-797.
192. Oakley H., Cole S. L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J. [et al.] Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation // *J Neurosci.* 2006. T. 26, N 40. C. 10129-10140.
193. Olney J. W. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion // *J Neuropathol Exp Neurol.* 1969. T. 28, N 3. C. 455-474.
194. Olney J. W., Ho O. L. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine // *Nature.* 1970. T. 227, N 5258. C. 609-611.

195. Ong Hwei Ling, De Souza Lorena Brito, Ambudkar Indu S. Role of TRPC channels in store-operated calcium entry // *Calcium Entry Pathways in Non-excitabile Cells* / Rosado e. b. J. A. – Cham: Springer, 2016. – C. 87-109.
196. Oules B., Del Prete D., Greco B., Zhang X., Lauritzen I., Sevalle J. [et al.] Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid-beta Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease // *J Neurosci*. 2012. T. 32, N 34. C. 11820-11834.
197. Parameshwaran K., Dhanasekaran M., Suppiramaniam V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation // *Exp Neurol*. 2008. T. 210, N 1. C. 7-13.
198. Paris D., Bachmeier C., Patel N., Quadros A., Volmar C. H., Laporte V. [et al.] Selective antihypertensive dihydropyridines lower Abeta accumulation by targeting both the production and the clearance of Abeta across the blood-brain barrier // *Mol Med*. 2011. T. 17, N 3-4. C. 149-162.
199. Paula-Lima A. C., Adasme T., Sanmartin C., Sebollela A., Hetz C., Carrasco M. A. [et al.] Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca^{2+} release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF // *Antioxid Redox Signal*. 2011. T. 14, N 7. C. 1209-1223.
200. Payne A. J., Kaja S., Koulen P. Regulation of ryanodine receptor-mediated calcium signaling by presenilins // *Receptors Clin Investig*. 2015. T. 2, N 1. C. e449.
201. Pchitskaya E., Kraskovskaya N., Chernyuk D., Popugaeva E., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. Stim2-Eb3 Association and Morphology of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons // *Sci Rep*. 2017. T. 7, N 1. C. 17625.
202. Peinelt C., Vig M., Koomoa D. L., Beck A., Nadler M. J., Koblan-Huberson M. [et al.] Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1) // *Nat Cell Biol*. 2006. T. 8, N 7. C. 771-773.
203. Peng J., Liang G., Inan S., Wu Z., Joseph D. J., Meng Q. [et al.] Dantrolene ameliorates cognitive decline and neuropathology in Alzheimer triple transgenic mice // *Neurosci Lett*. 2012. T. 516, N 2. C. 274-279.
204. Peters O., Fuentes M., Joachim L. K., Jessen F., Luckhaus C., Kornhuber J. [et al.] Combined treatment with memantine and galantamine-CR compared with galantamine-CR only in antedementia drug naive patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease // *Alzheimers Dement (N Y)*. 2015. T. 1, N 3. C. 198-204.
205. Pitts M. W. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice // *Bio Protoc*. 2018. T. 8, N 5. C. e2744.
206. Pochwat B., Sowa-Kucma M., Kotarska K., Misztak P., Nowak G., Szewczyk B. Antidepressant-like activity of magnesium in the olfactory bulbectomy model is associated with the AMPA/BDNF pathway // *Psychopharmacology (Berl)*. 2015. T. 232, N 2. C. 355-367.

207. Preskorn S., Macaluso M., Mehra D. O., Zammit G., Moskal J. R., Burch R. M. Randomized proof of concept trial of GLYX-13, an N-methyl-D-aspartate receptor glycine site partial agonist, in major depressive disorder nonresponsive to a previous antidepressant agent // *J Psychiatr Pract.* 2015. T. 21, N 2. C. 140-149.
208. Price K. A., Varghese M., Sowa A., Yuk F., Brautigam H., Ehrlich M. E., Dickstein D. L. Altered synaptic structure in the hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease with soluble amyloid-beta oligomers and no plaque pathology // *Mol Neurodegener.* 2014. T. 9. C. 41.
209. Putney J. W., Jr. Capacitative calcium entry in the nervous system // *Cell Calcium.* 2003. T. 34, N 4-5. C. 339-344.
210. Raschetti R., Albanese E., Vanacore N., Maggini M. Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials // *PLoS Med.* 2007. T. 4, N 11. C. e338.
211. Reese L. C., Laezza F., Woltjer R., Tagliatela G. Dysregulated phosphorylation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha in the hippocampus of subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // *J Neurochem.* 2011. T. 119, N 4. C. 791-804.
212. Renner M., Lacor P. N., Velasco P. T., Xu J., Contractor A., Klein W. L., Triller A. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5 // *Neuron.* 2010. T. 66, N 5. C. 739-754.
213. Rizzuto R., De Stefani D., Raffaello A., Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. T. 13, N 9. C. 566-578.
214. Roberts-Lewis J. M., Savage M. J., Marcy V. R., Pinsker L. R., Siman R. Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain // *J Neurosci.* 1994. T. 14, N 6. C. 3934-3944.
215. Rodriguez A., Ehlenberger D. B., Dickstein D. L., Hof P. R., Wearne S. L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images // *PLoS One.* 2008. T. 3, N 4. C. e1997.
216. Rogaeve E. I., Sherrington R., Rogaeve E. A., Levesque G., Ikeda M., Liang Y. [et al.] Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene // *Nature.* 1995. T. 376, N 6543. C. 775-778.
217. Rogaeve E. I., Sherrington R., Wu C., Levesque G., Liang Y., Rogaeve E. A. [et al.] Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease // *Genomics.* 1997. T. 40, N 3. C. 415-424.
218. Ronco V., Grolla A. A., Glasnov T. N., Canonico P. L., Verkhatsky A., Genazzani A. A., Lim D. Differential deregulation of astrocytic calcium signalling by amyloid-beta, TNFalpha, IL-1beta and LPS // *Cell Calcium.* 2014. T. 55, N 4. C. 219-229.

219. Ronicke R., Mikhaylova M., Ronicke S., Meinhardt J., Schroder U. H., Fandrich M. [et al.] Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors // *Neurobiol Aging*. 2011. T. 32, N 12. C. 2219-2228.
220. Ryazantseva M., Goncharova A., Skobeleva K., Erokhin M., Methner A., Georgiev P., Kaznacheeva E. Presenilin-1 Delta E9 Mutant Induces STIM1-Driven Store-Operated Calcium Channel Hyperactivation in Hippocampal Neurons // *Mol Neurobiol*. 2018. T. 55, N 6. C. 4667-4680.
221. Rybalchenko V., Hwang S. Y., Rybalchenko N., Koulen P. The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity // *Int J Biochem Cell Biol*. 2008. T. 40, N 1. C. 84-97.
222. Sanmartin C. D., Adasme T., Hidalgo C., Paula-Lima A. C. The antioxidant N-acetylcysteine prevents the mitochondrial fragmentation induced by soluble amyloid-beta peptide oligomers // *Neurodegener Dis*. 2012. T. 10, N 1-4. C. 34-37.
223. Sanmartin C. D., Veloso P., Adasme T., Lobos P., Bruna B., Galaz J. [et al.] RyR2-Mediated Ca(2+) Release and Mitochondrial ROS Generation Partake in the Synaptic Dysfunction Caused by Amyloid beta Peptide Oligomers // *Front Mol Neurosci*. 2017. T. 10. C. 115.
224. Sawamura S., Hatano M., Takada Y., Hino K., Kawamura T., Tanikawa J. [et al.] Screening of Transient Receptor Potential Canonical Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compounds // *Mol Pharmacol*. 2016. T. 89, N 3. C. 348-363.
225. Scheff S. W., Price D. A. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies // *Neurobiol Aging*. 2003. T. 24, N 8. C. 1029-1046.
226. Scholl M., Wall A., Thordardottir S., Ferreira D., Bogdanovic N., Langstrom B. [et al.] Low PiB PET retention in presence of pathologic CSF biomarkers in Arctic APP mutation carriers // *Neurology*. 2012. T. 79, N 3. C. 229-236.
227. Selkoe D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure // *Science*. 2002. T. 298, N 5594. C. 789-791.
228. Selkoe D. J., Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years // *EMBO Mol Med*. 2016. T. 8, N 6. C. 595-608.
229. Shankar G. M., Bloodgood B. L., Townsend M., Walsh D. M., Selkoe D. J., Sabatini B. L. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway // *J Neurosci*. 2007. T. 27, N 11. C. 2866-2875.
230. Shilling D., Mak D. O., Kang D. E., Foskett J. K. Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca²⁺ leak channels // *J Biol Chem*. 2012. T. 287. C. 10933-10944.
231. Shilling D., Muller M., Takano H., Mak D. O., Abel T., Coulter D. A., Foskett J. K. Suppression of InsP3 receptor-mediated Ca²⁺ signaling alleviates mutant presenilin-linked familial Alzheimer's disease pathogenesis // *J Neurosci*. 2014. T. 34, N 20. C. 6910-6923.

232. Simakova O., Arispe N. J. The cell-selective neurotoxicity of the Alzheimer's A β peptide is determined by surface phosphatidylserine and cytosolic ATP levels. Membrane binding is required for A β toxicity // *J Neurosci*. 2007. T. 27, N 50. C. 13719-13729.
233. Sinnen B. L., Bowen A. B., Gibson E. S., Kennedy M. J. Local and Use-Dependent Effects of beta-Amyloid Oligomers on NMDA Receptor Function Revealed by Optical Quantal Analysis // *J Neurosci*. 2016. T. 36, N 45. C. 11532-11543.
234. Snyder E. M., Nong Y., Almeida C. G., Paul S., Moran T., Choi E. Y. [et al.] Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta // *Nat Neurosci*. 2005. T. 8, N 8. C. 1051-1058.
235. Soboloff J., Spassova M. A., Tang X. D., Hewavitharana T., Xu W., Gill D. L. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function // *J Biol Chem*. 2006. T. 281, N 30. C. 20661-20665.
236. Solovyova N., Fernyhough P., Glazner G., Verkhratsky A. Xestospongins empty the ER calcium store but do not inhibit InsP $_3$ -induced Ca $^{2+}$ release in cultured dorsal root ganglia neurones // *Cell Calcium*. 2002. T. 32, N 1. C. 49-52.
237. Somavarapu A. K., Kepp K. P. Loss of stability and hydrophobicity of presenilin 1 mutations causing Alzheimer's disease // *J Neurochem*. 2016. T. 137, N 1. C. 101-111.
238. Spat A., Szanda G., Csordas G., Hajnoczky G. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling // *Cell Calcium*. 2008. T. 44, N 1. C. 51-63.
239. Stanton P. K., Potter P. E., Aguilar J., Decandia M., Moskal J. R. Neuroprotection by a novel NMDAR functional glycine site partial agonist, GLYX-13 // *Neuroreport*. 2009. T. 20, N 13. C. 1193-1197.
240. Stathopoulos P. B., Li G. Y., Plevin M. J., Ames J. B., Ikura M. Stored Ca $^{2+}$ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca $^{2+}$ entry // *J Biol Chem*. 2006. T. 281, N 47. C. 35855-35862.
241. Strittmatter W. J., Weisgraber K. H., Huang D. Y., Dong L. M., Salvesen G. S., Pericak-Vance M. [et al.] Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993. T. 90, N 17. C. 8098-8102.
242. Stutzmann G. E., Smith I., Caccamo A., Oddo S., Laferla F. M., Parker I. Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca $^{2+}$ disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice // *J Neurosci*. 2006. T. 26, N 19. C. 5180-5189.
243. Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N. J., Feske S. [et al.] Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice // *Neuron*. 2014. T. 82, N 1. C. 79-93.

244. Supnet C., Bezprozvanny I. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease // *Cell Calcium*. 2010. T. 47, N 2. C. 183-189.
245. Svoboda K., Tank D. W., Denk W. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts // *Science*. 1996. T. 272, N 5262. C. 716-719.
246. Tackenberg C., Brandt R. Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid-beta, wild-type tau, and R406W tau // *J Neurosci*. 2009. T. 29, N 46. C. 14439-14450.
247. Tackenberg C., Ghori A., Brandt R. Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease // *Curr Alzheimer Res*. 2009. T. 6, N 3. C. 261-268.
248. Tai Y., Feng S., Ge R., Du W., Zhang X., He Z., Wang Y. TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway // *J Cell Sci*. 2008. T. 121, N Pt 14. C. 2301-2307.
249. Talantova M., Sanz-Blasco S., Zhang X., Xia P., Akhtar M. W., Okamoto S. [et al.] Abeta induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. T. 110, N 27. C. E2518-2527.
250. Tang T. S., Tu H., Chan E. Y., Maximov A., Wang Z., Wellington C. L. [et al.] Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1 // *Neuron*. 2003. T. 39, N 2. C. 227-239.
251. Terry R. D., Masliah E., Salmon D. P., Butters N., Deteresa R., Hill R. [et al.] Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment // *Ann Neurol*. 1991. T. 30, N 4. C. 572-580.
252. Texido L., Martin-Satue M., Alberdi E., Solsona C., Matute C. Amyloid beta peptide oligomers directly activate NMDA receptors // *Cell Calcium*. 2011. T. 49, N 3. C. 184-190.
253. Theobald D. L. Presenilin adopts the ClC channel fold // *Protein Sci*. 2016. T. 25, N 7. C. 1363-1365.
254. Ting C. P., Maimone T. J. Total Synthesis of Hyperforin // *J Am Chem Soc*. 2015. T. 137, N 33. C. 10516-10519.
255. Tippens A. L., Pare J. F., Langwieser N., Moosmang S., Milner T. A., Smith Y., Lee A. Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca²⁺ channels in the rat hippocampus // *J Comp Neurol*. 2008. T. 506, N 4. C. 569-583.
256. Toglia P., Ullah G. The gain-of-function enhancement of IP3-receptor channel gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants increases the open probability of mitochondrial permeability transition pore // *Cell Calcium*. 2016. T. 60, N 1. C. 13-24.
257. Tomiyama T., Nagata T., Shimada H., Teraoka R., Fukushima A., Kanemitsu H. [et al.] A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia // *Ann Neurol*. 2008. T. 63, N 3. C. 377-387.

258. Tong B. C., Lee C. S., Cheng W. H., Lai K. O., Foskett J. K., Cheung K. H. Familial Alzheimer's disease-associated presenilin 1 mutants promote gamma-secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca^{2+} entry // *Sci Signal*. 2016. T. 9, N 444. C. ra89.
259. Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., Wang Z., Lee S.-F., Hao Y. H. [et al.] Presenilins form ER calcium leak channels, a function disrupted by mutations linked to familial Alzheimer's disease // *Cell*. 2006. T. 126. C. 981-993.
260. Tymianski M., Charlton M. P., Carlen P. L., Tator C. H. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons // *J Neurosci*. 1993. T. 13, N 5. C. 2085-2104.
261. Um J. W., Kaufman A. C., Kostylev M., Heiss J. K., Stagi M., Takahashi H. [et al.] Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein // *Neuron*. 2013. T. 79, N 5. C. 887-902.
262. Veng L. M., Mesches M. H., Browning M. D. Age-related working memory impairment is correlated with increases in the L-type calcium channel protein alpha1D (Cav1.3) in area CA1 of the hippocampus and both are ameliorated by chronic nimodipine treatment // *Brain Res Mol Brain Res*. 2003. T. 110, N 2. C. 193-202.
263. Verghese P. B., Castellano J. M., Garai K., Wang Y., Jiang H., Shah A. [et al.] ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. T. 110, N 19. C. E1807-1816.
264. Veugelen S., Saito T., Saido T. C., Chavez-Gutierrez L., De Strooper B. Familial Alzheimer's Disease Mutations in Presenilin Generate Amyloidogenic Abeta Peptide Seeds // *Neuron*. 2016. T. 90, N 2. C. 410-416.
265. Vlachos A., Korkotian E., Schonfeld E., Copanaki E., Deller T., Segal M. Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons // *J Neurosci*. 2009. T. 29, N 4. C. 1017-1033.
266. Wagner S. L., Ryneerson K. D., Duddy S. K., Zhang C., Nguyen P. D., Becker A. [et al.] Pharmacological and Toxicological Properties of the Potent Oral gamma-Secretase Modulator BPN-15606 // *J Pharmacol Exp Ther*. 2017. T. 362, N 1. C. 31-44.
267. Walsh D. M., Klyubin I., Fadeeva J. V., Cullen W. K., Anwyl R., Wolfe M. S. [et al.] Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo // *Nature*. 2002. T. 416, N 6880. C. 535-539.
268. Wang J., Lu R., Yang J., Li H., He Z., Jing N. [et al.] TRPC6 specifically interacts with APP to inhibit its cleavage by gamma-secretase and reduce Abeta production // *Nat Commun*. 2015. T. 6. C. 8876.
269. Wang Y., Mattson M. P. L-type Ca^{2+} currents at CA1 synapses, but not CA3 or dentate granule neuron synapses, are increased in 3xTgAD mice in an age-dependent manner // *Neurobiol Aging*. 2014. T. 35, N 1. C. 88-95.

270. White J. A., Mckinney B. C., John M. C., Powers P. A., Kamp T. J., Murphy G. G. Conditional forebrain deletion of the L-type calcium channel Ca V 1.2 disrupts remote spatial memories in mice // *Learn Mem.* 2008. T. 15, N 1. C. 1-5.
271. Woelk H., Burkard G., Grunwald J. Benefits and risks of the hypericum extract LI 160: drug monitoring study with 3250 patients // *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 1994. T. 7 Suppl 1. C. S34-38.
272. Wu B., Yamaguchi H., Lai F. A., Shen J. Presenilins regulate calcium homeostasis and presynaptic function via ryanodine receptors in hippocampal neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. T. 110, N 37. C. 15091-15096.
273. Wu H. Y., Hudry E., Hashimoto T., Kuchibhotla K., Rozkalne A., Fan Z. [et al.] Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation // *J Neurosci.* 2010. T. 30, N 7. C. 2636-2649.
274. Wu J., Ryskamp D. A., Liang X., Egorova P., Zakharova O., Hung G., Bezprozvanny I. Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model // *J Neurosci.* 2016. T. 36, N 1. C. 125-141.
275. Wu J., Shih H. P., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C. [et al.] Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment // *Chem Biol.* 2011. T. 18, N 6. C. 777-793.
276. Xia D., Kelleher R. J., 3rd, Shen J. Loss of Abeta43 Production Caused by Presenilin-1 Mutations in the Knockin Mouse Brain // *Neuron.* 2016. T. 90, N 2. C. 417-422.
277. Xia D., Watanabe H., Wu B., Lee S. H., Li Y., Tsvetkov E. [et al.] Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease // *Neuron.* 2015. T. 85, N 5. C. 967-981.
278. Xu P., Lu J., Li Z., Yu X., Chen L., Xu T. Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1 // *Biochem Biophys Res Commun.* 2006. T. 350, N 4. C. 969-976.
279. Yang G., Zhou R., Zhou Q., Guo X., Yan C., Ke M. [et al.] Structural basis of Notch recognition by human gamma-secretase // *Nature.* 2019. T. 565, N 7738. C. 192-197.
280. Yang Y. C., Lee C. H., Kuo C. C. Ionic flow enhances low-affinity binding: a revised mechanistic view into Mg²⁺ block of NMDA receptors // *J Physiol.* 2010. T. 588, N Pt 4. C. 633-650.
281. Yao L., Zhou Q. Enhancing NMDA Receptor Function: Recent Progress on Allosteric Modulators // *Neural Plast.* 2017. T. 2017. C. 2875904.
282. Yap K. A., Shetty M. S., Garcia-Alvarez G., Lu B., Alagappan D., Oh-Hora M. [et al.] STIM2 regulates AMPA receptor trafficking and plasticity at hippocampal synapses // *Neurobiol Learn Mem.* 2017. T. 138. C. 54-61.
283. Yoo A. S., Cheng I., Chung S., Grenfell T. Z., Lee H., Pack-Chung E. [et al.] Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry // *Neuron.* 2000. T. 27, N 3. C. 561-572.

284. Zanos P., Moaddel R., Morris P. J., Georgiou P., Fischell J., Elmer G. I. [et al.] NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites // *Nature*. 2016. T. 533, N 7604. C. 481-486.
285. Zhang H., Liu J., Sun S., Pchitskaya E., Popugaeva E., Bezprozvanny I. Calcium signaling, excitability, and synaptic plasticity defects in a mouse model of Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimers Disease*. 2015. T. 45, N 2. C. 561-580.
286. Zhang H., Sun S., Herreman A., De Strooper B., Bezprozvanny I. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis // *J Neurosci*. 2010. T. 30, N 25. C. 8566-8580.
287. Zhang H., Sun S., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Fon Tacer K., Bezprozvanny I. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment // *J Neurosci*. 2016. T. 36, N 47. C. 11837-11850.
288. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Saito T., Saido T., Bezprozvanny I. Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease // *J Neurosci*. 2015. T. 35, N 39. C. 13275-13286.
289. Zhang S. L., Yu Y., Roos J., Kozak J. A., Deerinck T. J., Ellisman M. H. [et al.] STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane // *Nature*. 2005. T. 437, N 7060. C. 902-905.
290. Zhang Y., Li P., Feng J., Wu M. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease // *Neurol Sci*. 2016. T. 37, N 7. C. 1039-1047.
291. Zheng M., Liu J., Ruan Z., Tian S., Ma Y., Zhu J., Li G. Intrahippocampal injection of Abeta1-42 inhibits neurogenesis and down-regulates IFN-gamma and NF-kappaB expression in hippocampus of adult mouse brain // *Amyloid*. 2013. T. 20, N 1. C. 13-20.
292. Zhou H. S., Liu D. P., Liang C. C. Challenges and strategies: the immune responses in gene therapy // *Med Res Rev*. 2004. T. 24, N 6. C. 748-761.
293. Zhou J., Du W., Zhou K., Tai Y., Yao H., Jia Y. [et al.] Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses // *Nat Neurosci*. 2008. T. 11, N 7. C. 741-743.
294. Zhou Q., Homma K. J., Poo M. M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses // *Neuron*. 2004. T. 44, N 5. C. 749-757.
295. Zhou R., Yang G., Guo X., Zhou Q., Lei J., Shi Y. Recognition of the amyloid precursor protein by human gamma-secretase // *Science*. 2019. T. 363, N 6428.
296. Zhou Y., Mancarella S., Wang Y., Yue C., Ritchie M., Gill D. L., Soboloff J. The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels // *J Biol Chem*. 2009. T. 284, N 29. C. 19164-19168.
297. Zolezzi J. M., Carvajal F. J., Rios J. A., Ordenes D., Silva-Alvarez C., Godoy J. A., Inestrosa N. C. Tetrahydroperforin induces mitochondrial dynamics and prevents mitochondrial Ca^{2+} overload after

Abeta and Abeta-AChE complex challenge in rat hippocampal neurons // Journal of Alzheimers Disease.
2013. T. 37, N 4. C. 735-746.