

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*

**ТЮМЕНЦЕВ**

**Михаил Алексеевич**

**АНАЛИЗ ВКЛАДА ДИСФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ В  
РАЗВИТИЕ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС OXYS**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
Колосова Наталия Гориславовна

Новосибирск – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ .....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	9
1. Болезнь Альцгеймера .....	9
1.1. Генетические факторы риска спорадической формы БА .....	12
1.2. Гипотеза амилоидного каскада и БА .....	15
1.3. Дисфункция митохондрий и окислительный стресс как ключевые события в патогенезе БА.....	19
1.4. Антиоксиданты в профилактике и лечении БА. Перспективы использования адресованных в митохондрии молекул .....	32
2. Биологические модели БА.....	35
2.1. Генно-модифицированные модели БА.....	37
2.2. Нетрансгенные модели БА .....	38
2.3. Крысы линии OXYS как модель спорадической формы БА.....	40
3. Заключение.....	43
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	44
РЕЗУЛЬТАТЫ .....	49
1. Изменения с возрастом морфологических параметров митохондрий пирамидных нейронов гиппокампа крыс OXYS.....	49
2. Нарушение митохондриальной динамики в нейронах гиппокампа крыс OXYS.....	55
3. Локализация мономерных форм пептида бета-амилоида в мозге крыс OXYS.....	63
4. Генерация активных форм кислорода (АФК) митохондриями мозга крыс Вистар и OXYS разного возраста.....	64
5. Изменение экспрессии UCP2 в коре и гиппокампе крыс OXYS с возрастом .....	66
6. Изменения активности комплексов дыхательной цепи митохондрий гиппокампа крыс Вистар и OXYS с возрастом.....	67
7. Влияние митохондриального антиоксиданта SkQ1 структурно-функциональные параметры митохондрий старых крыс OXYS.....	69
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	74

Анализ связи развития признаков БА у крыс OXYS с дисфункцией митохондрий.....	75
Анализ влияния антиоксиданта SkQ1 на структурно-функциональное состояние митохондрий крыс OXYS .....	84
Заключение.....	87
ВЫВОДЫ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ .....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	90

## Список сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат  
АФК – Активные формы кислорода  
БА – болезнь Альцгеймера  
мтДНК – митохондриальная ДНК  
ЭПР – эндоплазматический ретикулум  
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь  
ЦНС – центральная нервная система  
А $\beta$  – бета-амилоид  
APP – amyloid precursor protein  
CA – *cornu ammonis*  
DRP1 – dynamin-1-like protein  
MFN1/2 – mitofusin 1/2  
MOAS – mitochondria-on-a-string  
PSEN1/2 – presenelin 1/2  
SkQ1 – пластохинонил-децил-трифенилфосфоний  
UCP2 – uncoupling protein 2

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое приводит к атрофическим изменениям мозга и деменции. Заболеваемость им растет с увеличением продолжительности жизни и постарением населения, эффективных методов профилактики и лечения БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза. В соответствии с доминирующей гипотезой «амилоидного каскада», центральным событием в патогенезе БА становится накопление нейротоксических форм пептида амилоида-бета ( $A\beta$ ), приводящее к образованию амилоидных бляшек, гиперфосфорилированию тау-белка и формированию нейрофибриллярных клубков, синаптической недостаточности, гибели нейронов, воспалению, митохондриальной дисфункции и окислительному стрессу (Morley et al., 2012). Однако постепенно стало очевидным, что эта гипотеза оправдана только для ранней, наследственной формы БА (~5% случаев), а при поздней, спорадической форме заболевания (далее – БА), на которую приходится ~95% случаев, гиперпродукция  $A\beta$  становится вторичным событием. Как ключевой фактор, инициирующий развитие спорадической БА, рассматривается дисфункция митохондрий. Согласно гипотезе «митохондриального каскада» (Swerdlow, 2014), снижение синтеза АТФ и окислительный стресс приводят к чрезмерной продукции  $A\beta$ , который оказывает токсическое воздействие на митохондрии, усугубляя нейродегенеративные процессы.

Представление о том, что митохондрии играют ключевую роль в старении и развитии связанных с ним заболеваний впервые сформулировал Д. Харман (Harman, 1972). Оно легло в основу сформулированной им митохондриальной свободнорадикальной теории старения, согласно которой старение обусловлено накоплением повреждений, вызванным образованием активных форм кислорода (АФК) (Harman, 2009). Однако в последние годы стало очевидным, что усиленная генерация АФК не является ни инициатором, ни

основной причиной старения (Payne, Chinnery, 2015). Более того, эпизодическое усиление митохондриями генерации АФК, играющих важную регуляторную роль, вызывает изменения, способные увеличить продолжительность жизни организма (Ristow, Schmeisser, 2014). Также оказалось, что дисфункция митохондрий может способствовать старению независимо от образования АФК – так, не только их метаболическая дисфункция, но и нарушения митохондриальной динамики и коммуникации с другими органеллами, в частности, с эндоплазматическим ретикуломумом также способствуют старению. Таким образом, не вызывает сомнений связь патогенеза БА с дисфункцией митохондрий, однако её вклад в переход от «здорового» старения к развитию этого заболевания остается неясным. В значительной степени это обусловлено невозможностью исследовать его у людей и отсутствием адекватных биологических моделей БА, большинство которых воспроизводит редкие наследственные формы заболевания, связанные с мутациями в генах PSEN1, PSEN2 и APP.

**Степень разработанности темы исследования.** Доказано, что уникальной моделью спорадической формы БА является линия преждевременно стареющих крыс OXYS (Stefanova et al., 2014a), у которых развиваются все ключевые признаки заболевания: деструктивные изменения нейронов и их гибель, синаптическая недостаточность, дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование тау-белка, усиленное накопление A $\beta$ 1-42 и образование амилоидных бляшек в мозге, нарушения поведения и снижение способности к обучению и памяти (Колосова и др., 2014; Stefanova et al., 2014a, Stefanova et al., 2015). Дисфункция митохондрий рассматривается как наиболее вероятная причина преждевременного старения крыс. Недавно показано, что прогрессия признаков БА у крыс OXYS тесно связана со структурно-функциональными изменениями митохондрий (Stefanova et al., 2015, 2016). На развитие ранних нарушений митохондриальной функции у крыс OXYS косвенно указывает значительное повышение в период раннего

онтогенеза уровня протяженной делеции (4834 пар оснований) митохондриальной ДНК (Лощенова и соавт., 2015), потенциально способной приводить к энергетическому дефициту клеток. Тем не менее, исследование энергетического метаболизма мозга методом ЯМР не выявило признаков энергетического дефицита в мозге крыс OXYS вплоть до возраста 3 мес. (Sergeeva et al., 2006). В результате вопрос о вкладе структурно-функциональных изменений митохондрий в инициацию и развитие патологических молекулярных каскадов БА у крыс OXYS остается открытым. Представляется актуальным оценить структурные изменения митохондрий крыс OXYS и их функциональной активности в период развития признаков БА, когда энергетическая недостаточность играет значительную роль и может быть основным событием, которое приводит к проявлению клинических симптомов. Одним из подходов к изучению механизмов развития заболеваний является исследование влияния на него препаратов, способных влиять на этот процесс, примером которых является митохондриальный антиоксидант пластохинонил-децил-трифенилфосфоний (SkQ1), нейропротекторные свойства которого ранее доказаны.

**Цель работы** - исследовать пути нарушения функций митохондрий и их вклад в развитие и прогрессию признаков БА у крыс OXYS.

Для ее достижения были поставлены следующие **задачи**:

в возрасте 20 дней – в период, предшествующий развитию признаков БА, в возрасте 4-5 месяцев – в период манифестации признаков заболевания и в возрасте 18-24 месяца – в период активной прогрессии признаков БА у крыс OXYS исследовать (используя крыс Вистар как контроль):

- 1) ультраструктуру митохондрий пирамидальных нейронов области CA1 гиппокампа;
- 2) уровни основных белков, опосредующих митохондриальную динамику: митофузинов MFN1 и MFN2 и динамин-1-подобного белка DRP1:

3) активность комплексов дыхательной цепи I, IV и V в митохондриях гиппокампа;

4) генерацию АФК митохондриями мозга в различных метаболических состояниях, а также уровень белкового продукта гена митохондриального белка-разобщителя *UCP2* - регулятора генерации АФК в гиппокампе и коре мозга.

5) Оценить связь нейропротекторных эффектов митохондриального антиоксиданта SkQ1 с его влиянием на ультраструктурные параметры митохондрий старых животных.

**Научная новизна.** Впервые охарактеризованы изменения количества и ультраструктуры митохондрий в нейронах гиппокампа крыс с периода завершения формирования мозга до старческого возраста. Доказано, что развитию признаков БА у крыс OXYS предшествуют структурно-функциональные изменения митохондрий гиппокампа: в доклинический период (возраст 20 дней) регистрируется снижение, по сравнению с крысами Вистар, активности дыхательной цепи, усилены генерация АФК и митохондриальное слияние, ведущее к образованию крупных митохондрий. Манифестация (возраст 4-5 мес.) и прогрессия (18-24 мес.) признаков БА у крыс OXYS протекают на фоне значительно сниженного количества митохондрий в нейронах гиппокампа, снижения активности дыхательной цепи, нарушений их ультраструктуры, митохондриальной динамики и коммуникации с ЭПР при отсутствии отличий от контрольных крыс Вистар в уровне генерации АФК митохондриями мозга. Установлено, что активно накапливающийся в период активной прогрессии признаков БА в нейронах гиппокампа крыс OXYS бета амилоид локализуется в мембране митохондрий, их матриксе, а также в цитоплазме, ядре и отростках нейронов. Впервые показано, что способность митохондриального антиоксиданта SkQ1 смягчать проявления признаков БА у старых крыс OXYS на стадии значительных



нейродегенеративных изменений связана с подавлением деструктивных изменений митохондриального аппарата в нейронах гиппокампа.

**Теоретическая и практическая значимость.** Получены убедительные аргументы в поддержку гипотезы «митохондриального каскада», согласно которой дисфункция митохондрий предшествует и способствует накоплению бета амилоида и развитию нейродегенеративных процессов при БА. Выявленные на крысах OXYS и Вистар эффекты SkQ1 демонстрируют определенную эффективность использования этого направленного в митохондрии антиоксиданта в профилактике старения мозга и развития характерных для БА нейродегенеративных процессов даже на стадии выраженных нейродегенеративных изменений.

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

1. Развитию признаков БА у крыс OXYS предшествуют структурно-функциональные изменения митохондриального аппарата нейронов гиппокампа, которые усугубляются при манифестации и прогрессии заболевания.
2. Способность митохондриального антиоксиданта SkQ1 смягчать проявление ключевых проявлений БА у старых крыс OXYS связана с частичным восстановлением структурно-функциональных параметров митохондрий нейронов.

## **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1. Болезнь Альцгеймера**

Болезнь Альцгеймера (БА) это нейродегенеративное заболевание, в ходе которого развиваются атрофические изменения мозга, гибель нейронов, нарушения внимания и памяти, следствием которой становятся прогрессирующая деменция. Смерть наступает в течение 3-9 лет после

постановки диагноза. Методов лечения и профилактики БА на данный момент не разработано.

Развитие заболевания сопровождается, помимо гибели нейронов, синаптической недостаточностью, накоплением токсических олигомеров и внеклеточных бляшек бета-амилоида (Аβ, Аβета), внутриклеточным образованием нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного тау-белка, нарушением функции митохондрий, снижением потребления мозгом глюкозы и хроническим нейровоспалением, что клинически проявляется в прогрессирующем снижении когнитивных функций (Morley et al., 2012). Заболеваемость БА растет с возрастом, удваиваясь каждые 5 лет после возраста 65 лет (Feng & Wang, 2012). На данный момент БА является основной причиной развития деменции среди пожилых людей (Manavalan et al. 2013). На фоне увеличения продолжительности жизни и связанного с ним постарения населения развитых и развивающихся стран ожидается, что к 2050 году общая численность людей с диагнозом «болезнь Альцгеймера» превысит 115 миллионов (Morley et al., 2012). В этой связи исследования фундаментальных механизмов БА и разработка основанных на их знании патогенетически обоснованных способов профилактики, диагностики и лечения приобрели особую актуальность.

Выделяют две основные формы болезни Альцгеймера: наследственная, семейная форма БА (БА с ранним началом) и спорадическая форма БА (БА с поздним началом). Семейная форма БА связана с генетическими мутациями и наследуется как аутосомно-доминантный признак. Когнитивные нарушения при семейной форме БА начинают проявляться в возрасте 40-55 лет.

Первые мутации, связанные с наследственной формой БА, были обнаружены в гене APP, кодирующем белок-предшественник амилоида (Goate et al., 1991). Белок APP, после синтеза на шероховатом ЭПР и модификации в аппарате Гольджи, транспортируется к плазматической мембране клетки, где подвергается разрезанию системами секретаз (альфа-, бета- и гамма-). Разрезание с участием секретаз может протекать по одному из двух путей –

неамилоидогенному при последовательном участии альфа- и гамма-секретазы, в ходе которого образуются полипептиды P3 и A $\beta$ , и амилоидогенному, в ходе которого, при участии бета- и гамма-секретазы образуются полипептиды sAPP $\beta$ , C99 и А $\beta$  длиной 40-42 аминокислоты. На данный момент описано более 30 мутаций (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>), которые ответственны за 14% случаев аутосомно-доминантной наследственной формы БА. Следует отметить, что синдром Дауна приводит к повышению дозы гена APP, располагающегося на 21 хромосоме. С этим связывается развитие у пациентов с синдромом Дауна БА-подобной деменции после возраста 40 лет (Geller & Potter, 1999; Raux et al., 2005).

Мутации, ответственные за развитие семейной формы БА, обнаружены также в генах PSEN1 (Sherrington et al., 1995) и PSEN2 (Levy-Lahad et al., 1995), кодирующих белки пресенилины, входящие в состав комплекса гамма-секретазы. Всего для этих генов описано более 200 мутаций, приводящих к развитию семейной формы БА, которые вместе ответственны за 85% всех случаев наследственной формы БА (Guerreiro et al., 2012). Интересно отметить, что не обнаружено связанных с семейной формой БА мутаций в гене VASE, кодирующем бета-секретазу, также участвующую в амилоидогенном процессинге APP.

Важно, что несмотря на большую изученность наследственной формы БА, эти случаи составляют только 1–5% (Thies, Bleiler, 2011; Grimm, Friedland, & Eckert, 2016) от общей заболеваемости БА. Основная доля заболеваемости БА приходится на ненаследственную спорадическую форму, симптомы которой начинают проявляться, как правило, после 65 лет. В то время как развитие наследственной формы БА является следствием патологических мутаций, события, запускающие развитие спорадической БА, остаются неизвестными. Ряд факторов риска повышает шанс развития спорадической БА – среди них есть как генетические факторы, которые будут обсуждены в следующей главе, так и внешние, негенетические факторы – избыточный вес, инсулинорезистентность, перенесенные черепно-мозговые травмы (Morris et

al., 2014b). При этом важно отметить, что главным фактором риска для спорадической формы БА является возраст. Старение мозга и БА имеют ряд общих признаков, таких как гипометаболизм и накопление маркеров оксидативного стресса (Mattson 2004; Swerdlow 2011; Yin et al. 2014). В то же время, остается неясным, что обуславливает непосредственный переход от «здорового» старения мозга к развитию БА.

### **1.1. Генетические факторы риска спорадической формы БА**

Помимо ряда мутаций, непосредственно вызывающих семейную форму болезни Альцгеймера, характеризующуюся ранним началом и быстрым течением, выявлены мутации, являющиеся факторами риска спорадической формы БА. Показано, что мутации в генах APP, PSEN1, PSEN2 и MAPT, не вызывающие наследственную форму БА, могут, тем не менее, являться факторами риска для спорадической болезни Альцгеймера (Sassi et al., 2014).

Широко известна ассоциация ε4 аллеля гена аполипопротеина Е (изоформа АРОЕ4) с повышенным риском развития БА (Mitsui, Tsuji, 2014). Одной из предполагаемых функций белка АРОЕ является его участие в гомеостазе холестерина в мозге (Martins et al., 2006). Изоформа АРОЕ4 ответственна за снижение расщепления Абета и повышенное накопление и агрегацию Абета, как показано *in vitro* и *in vivo* (Bu 2009). АРОЕ4 также может играть важную роль в запуске митохондриальной дисфункции. По сравнению с другими изоформами этого белка – АРОЕ2 и АРОЕ3, изоформа АРОЕ4 отличается третичной структурой белка и, согласно исследованиям, участвует в ряде молекулярных событий: снижении деградации Абета; транспорте липидов и холестерина; разрезании APP; гиперфосфорилировании тау-белка; снижении синаптической пластичности (Bu, 2009; Liu, 2013). Важно отметить, что экспериментальная экспрессия аллеля АРОЕ4 снижает экспрессию субъединиц нескольких комплексов дыхательной цепи, а также активность комплекса IV митохондрий (Chen et al., 2011). Это может объясняться тем, что липид-связывающий участок АРОЕ4 критически важен для взаимодействия с

митохондриями. На нейрональной клеточной модели было показано, что участок аминокислотной цепи APP 272–299 связывает ряд субъединиц комплексов III и IV и значительно снижает их функциональную активность (Chen et al., 2011; Nakamura et al., 2009).

Среди других генетических факторов риска БА, полногеномный анализ ассоциаций выявил ген транслоказы наружной митохондриальной мембраны TOMM40, участвующей в транспорте белков из цитоплазмы в митохондрии (Roses A.D. et al., 2010). В ходе клинических исследований было показано, что носители поли-Т полиморфизма (rs10524523) в этом гене находятся в группе риска по заболеваемости спорадической формой БА (Gottschalk et al. 2014; Roses et al. 2010). Нарушения TOMM40-зависимого транспорта белков, необходимых для окислительного фосфорилирования и поддержания редокс-потенциала митохондрий, может способствовать развитию окислительного стресса, биоэнергетического дефицита и приводить к апоптотической гибели клеток (Wottschalk et al., 2015).

В ходе исследований с использованием полногеномного поиска ассоциаций, был выявлен ряд других генов, полиморфизмы в которых также связаны с повышенным риском развития спорадической болезни Альцгеймера. Многие из этих генов принадлежат к следующим метаболическим путям: метаболизм холестерина (ABCA7, CLU), врожденный иммунитет (CLU, CR1, TREM), транспорт эндосом (BIN1, PICALM, SORL1). (Guerreiro et al., 2015).

Эпидемиологические исследования показывают, что наличие в анамнезе прямых предков по материнской линии, болевших спорадической формой БА, также является фактором риска (Mosconi et al., 2010). Было предположено, что гены митохондриальной ДНК (мтДНК) с большей вероятностью вносят вклад в сниженную активность комплекса IV по сравнению с ядерными генами, поскольку поздняя форма болезни Альцгеймера не демонстрирует признаков классического Менделевского наследования (Parker, 1990). В общем случае заболеваемость поздней формой имеет спорадический характер, однако риск

развития БА следует некоторым правилам, характерным для наследования мтДНК – наследованию по материнской линии, гетероплазмии, пороговому эффекту и митотической сегрегации. Таким образом, спорадическая форма БА демонстрирует признаки нарушения митохондриальной функции, характерные для митохондриальных заболеваний (Parker, 1990; Mosconi et al., 2009; Swerdlow, Burns, Khan 2010).

Таким образом, хотя вероятность развития спорадической формы БА определяется генетическими факторами риска от обоих родителей, заболеваемость матерей оказывается более значительным фактором риска. Этот эффект сохраняется в том числе и когда БА у родителей развивалась в сравнительно раннем возрасте, то есть обнаруженная связь материнской заболеваемости БА с повышенным риском развития заболевания у детей не может быть объяснена большей продолжительностью жизни у женщин, из-за которой вероятность развития связанных со старением нейродегенеративных заболеваний у женщин повышается.

Показано также, что по сравнению с детьми от отцов, у которых развилась БА, дети от матерей с БА с большей вероятностью проявляют характерные для БА признаки (эндофенотипы) – снижение потребления глюкозы и нарушение кровоснабжения мозга, повышение содержания в мозге амилоида и маркеров оксидативного стресса, признаки атрофии нервной ткани, а также снижение активности комплекса IV дыхательной цепи митохондрий в тромбоцитах (Cardoso et al., 2004; Mosconi et al., 2011; Morris et al., 2014b).

Эти результаты нашли подтверждение в исследовании цитоплазматических гибридов – линий клеток, в которые был осуществлен перенос мтДНК от пациентов с БА. Цитоплазматические гибриды получают за счет слияния лишенных ядра клеток, имеющих митохондрии (например, тромбоцитов) с лишенными мтДНК ( $\rho 0$ ) клетками, которые затем могут быть переведены в культуру. Таким образом, после переноса единственным элементом, который может реплицироваться и переноситься в следующее поколение оказывается мтДНК, тогда как прочие биополимеры и малые

молекулы подвергаются разбавлению и/или разрушению (Swerdlow, Burns, Khan, 2010).

Исследования, проведенные с использованием цитоплазматических гибридов, показали, что перенос мтДНК от пациентов с БА в клетки линии SH-SY5Y приводит к снижению активности комплекса IV от 16% до 50% (Sheehan et al., 1997; Cardoso et al., 2004; Silva et al., 2013). Также исследования с использованием цитоплазматических гибридов продемонстрировали ряд других характерных для БА изменений, включающих активизацию воспалительных процессов, увеличение содержания маркеров оксидативного стресса, повышение уровня А $\beta$ , снижение потребления глюкозы и кислорода, сдвиг митохондриальной динамики в сторону деления и накопление поврежденных митохондрий (Silva et al., 2013; Vijur et al., 1999; De Sarno et al., 2000; Trimmer et al., 2000).

## **1.2. Гипотеза амилоидного каскада и БА**

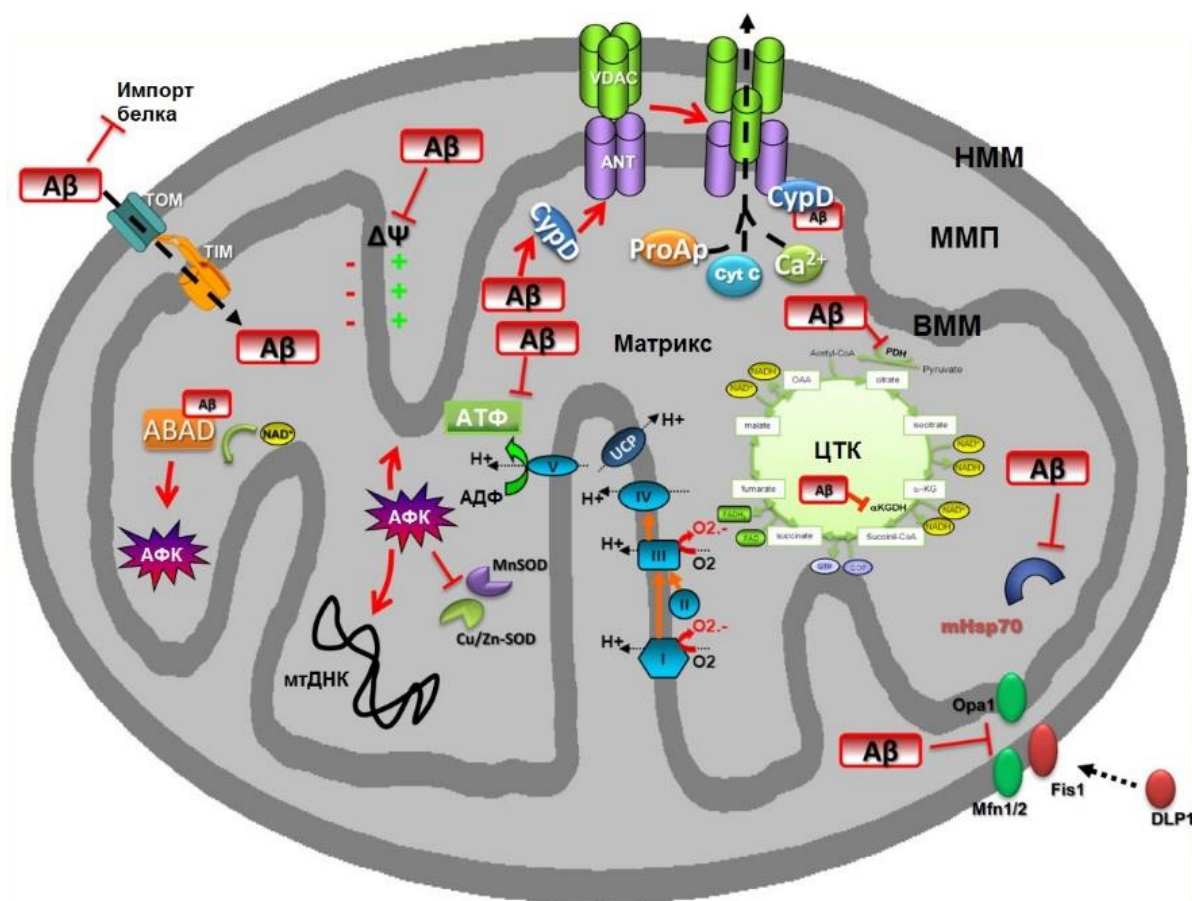
Существует несколько гипотез патогенеза болезни Альцгеймера, но независимо от того, какой предполагаемый механизм рассматривается как основной, на структурно-функциональном уровне в основе развития деменции при БА лежат гибель нейронов, синаптическая недостаточность и связанные с ней нарушения нейропластичности.

Согласно гипотезе амилоидного каскада, основным звеном патогенеза БА является нарушение процессинга трансмембранного белка-предшественника амилоида APP. Естественным продуктом последовательного расщепления APP посредством белка бета-секретазы и белкового комплекса, известного как гамма-секретаза, является бета-амилоидный пептид (Hardy, Selkoe, 2002).

Согласно гипотезе амилоидного каскада, на ранних стадиях БА происходит нарушение процессинга APP, в результате чего накапливается пептид бета-амилоида длиной 40-42 аминокислоты. При этом форма бета-амилоидного пептида длиной 42 аминокислоты считается более токсичной (Chen, Glabe, 2006; Haass & Selkoe, 2007). Бета-амилоидные пептиды могут

существовать в растворимой форме, образовывать олигомеры, амилоидные фибриллы и крупные внеклеточные агрегаты размером до нескольких десятков микрометров, называемые амилоидными бляшками. В течение долгого времени образование амилоидных бляшек считалось одним из центральных элементов патогенеза болезни Альцгеймера. В настоящее время, в связи с исследованиями, показавшими, что количество амилоидных бляшек не коррелирует с тяжестью симптомов БА, в рамках гипотезы амилоидного каскада предполагается, что основная роль в развитии патологии принадлежит нейротоксическому действию олигомерных форм Аβета (Haass & Selkoe, 2007; Selkoe, 2013). Предполагается, что олигомеры бета-амилоида способны разрушать синаптические связи и вызывать гибель нейронов за счет явления эксайтотоксичности (гиперактивации глутаматных рецепторов, за которой следует гибель клетки) (De Felice et al., 2007). Также показано, что бета-амилоид может проникать в митохондрии посредством транслоказ (Petersen et al., 2008), где он способен нарушать работу цепи переноса электронов и цикла Кребса, повышать образование активных форм кислорода (АФК), а также, за счет взаимодействия с циклофилином D, способствовать образованию митохондриальных пор (mPTP), вызывающих разрушение митохондрий и последующую гибель клетки (Eckert et al., 2011) (рис. 1). Тем не менее, точный механизм, по которому бета-амилоид оказывает непосредственное нейротоксическое действие, до конца не ясен и продолжает активно исследоваться.





**Рис. 1.** Токсическое действие Аβета в митохондриях. НММ – наружная митохондриальная мембрана, ММП – межмембранное пространство, ВММ – внутренняя митохондриальная мембрана (по Eckert et al., 2011)

В какой именно степени различные формы бета-амилоида участвуют в нейродегенеративных изменениях также является активно обсуждаемым вопросом (Cerasoli, Ryadnov, Austen, 2015; Karran, Mercken, Strooper, 2011). В (Swerdlow et al., 2014) приводятся данные о том, что формирование бляшек полностью останавливается еще до начала первых клинических изменений. В данной работе роль изначального инициатора патологического процесса при БА отводится снижению митохондриальной функции с возрастом — под действием генетических факторов и факторов среды – в то время как амилоидные бляшки оказываются закономерно возникающим следствием старения мозга — это подтверждается тем фактом, что они обнаруживаются и в ткани мозга людей, у которых не развилось никаких признаков болезни Альцгеймера (Price et al., 2009).

Важно отметить, что как синтез APP, так и его разрезание по «амилоидогенному» бета-гамма-секретазному пути не являются строго патологическими процессами. Продукты расщепления APP участвуют в регуляции роста и дифференциации нейронов, свертывании крови, синаптогенезе, образовании нервных отростков. Бета-амилоидный пептид является нормальным продуктом разрезания APP и в небольшой концентрации обнаруживается и в здоровом мозге (Puzzo et al., 2015). В то же время, в норме характерно преобладание формы Абета длиной 40 аминокислот, тогда как при БА преобладает синтез формы длиной 42 аминокислоты (Haass & Selkoe, 2007)). В физиологической концентрации Абета обладает нейропротекторной активностью, бета-амилоидный пептид также участвует в транспорте холестерина, росте нервных отростков, работе синапсов (Dawkins, Small, 2014).

Образование бета-амилоида и его олигомерных форм является обратимым. В регуляции Абета участвует ряд ферментов, способных расщеплять его мономерные формы: неприлизин, инсулин-разлагающий фермент, катепсин В. Некоторые шапероны, такие как Hsp70, участвуют в деградации скоплений бета-амилоидного пептида. В результате в организме в норме существует баланс между образованием бета-амилоида и его разрушением. Предполагается, что избыточное накопление бета-амилоида может быть следствием нарушения этого баланса, происходящего как за счет повышения его синтеза, так и за счет снижения разрушения (Mawuenyega et al., 2010).

Таким образом, несмотря на то, что метаболизм бета-амилоида играет значимую роль в патогенезе БА, его основополагающая роль в запуске патогенеза заболевания ставится под сомнение, и точный механизм, по которому Абета оказывает токсическое действие, остается во многом не ясным. В то время как изменения разрезания APP и синтеза Абета несомненно связаны с развитием патологии, свидетельства в пользу его причинной роли непоследовательны (Morris et al., 2014a; Herrup, 2015). Представление о

накоплении бета-амилоидного пептида и продуктов его олигомеризации и агрегации как о начальных событиях в развитии БА осложнено отсутствием корреляции между количеством различных форм Аβета и степенью нейрональной недостаточности, потери нейронов и тяжестью деменции (Drachman, 2014), а также неспособностью методов лечения, направленных на удаление различных форм Аβета – как растворимых, так и входящих в состав амилоидных бляшек – остановить или замедлить развитие заболевания (Fox et al., 2005; Tabira, 2010).

В качестве раннего этапа развития БА, способного объяснить патогенез заболевания и его ранние стадии выступает развивающееся задолго до проявления клинических симптомов и развития деменции нарушение снабжения мозга питательными веществами, энергетический дефицит и дисфункция митохондрий головного мозга. Интересно отметить, что нарушение функции митохондрий не ограничивается ЦНС — митохондриальные нарушения у пациентов с БА наблюдаются также в фибробластах, лимфоцитах и тромбоцитах (Swerdlow, 2012). Таким образом, БА демонстрирует признаки системного заболевания, клинические симптомы которого проявляются прежде всего в ЦНС, но при этом патологические изменения охватывают весь организм и могут быть обнаружены в различных типах клеток (Morris et al., 2014b) – что позволяет в определенной степени исследовать прогрессию заболевания на периферических клетках, полученных от пациентов, не прибегая к биопсии мозга.

Хотя известен ряд факторов риска и описано большое количество изменений на тканевом, клеточном и организменном уровне, механизм, запускающий развитие БА, остается неясным.

### **1.3. Дисфункция митохондрий и окислительный стресс как ключевые события в патогенезе БА**

Митохондрии, присутствующие во всех типах клеток человека кроме эритроцитов, выполняют ряд функций, среди которых основной является

синтез АТФ, необходимого для протекания энергозависимых клеточных процессов. Кроме того, митохондрии участвуют в регуляции апоптоза, гомеостазе кальция, синтезе гема и метаболизме липидов. Нейроны являются высокоактивными клетками, требующими для своего функционирования большого количества АТФ в связи с этим их цитоплазма содержит большое количество митохондрий, зачастую имеющих вытянутую, разветвленную форму. Ряд исследований свидетельствует в пользу того, что митохондрии играют роль в механизме, за счет которого Аβ приводит к синаптической недостаточности и нейродегенерации (Swerdlow, 2011). Важно отметить, что как амилоидный пептид Аβ, так и полноразмерный белок APP накапливаются в митохондриях мозга пациентов с БА (Spuch, Ortolano, Navarro, 2012).

Митохондриальная дисфункция рассматривается как механизм, обуславливающий развитие ранних стадий БА, поскольку энергетическая недостаточность является характерной чертой как мозга пациентов с БА, так и клеток их периферических тканей (Eckert, Schmitt, Götz, 2011). Впервые изменения окислительного фосфорилирования при БА были обнаружены еще в 1960-е годы (Friede, 1965). В дальнейшем было установлено, что для нейронов пациентов с БА характерны митохондриальная дисфункция, повышенный уровень маркеров окислительного стресса (Keller et al, 2005), нарушение баланса между делением и слиянием митохондрий (Yan et al., 2013), сниженная способность митохондрий регулировать уровень кальция и синтезировать АТФ (Cali et al., 2012).

Головной мозг в целом высоко требователен к снабжению энергией – на этот орган приходится около 20% метаболической активности организма у людей в покое (Grimm, Eckert, 2017). В то же время для синтеза АТФ в ходе окислительного фосфорилирования в митохондриях нейроны мозга используют почти исключительно глюкозу. Не имея значительных энергетических резервов, они нуждаются в контроле точного соответствия интенсивности кровоснабжения метаболической активности ткани в каждый

отдельный момент (Robinson & Jackson, 2016). Таким образом, мозг оказывается высокочувствителен к нарушениям энергетического метаболизма. Вместе с тем такая особенность позволяет точно отслеживать энергетическую активность мозга с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Ранние исследования с помощью ПЭТ выявили снижение потребления глюкозы в мозге пациентов с БА (de Leon, 1983). Сниженное потребление глюкозы было обнаружено в отдельных регионах мозга, включая заднюю височную и теменную кору, пояс и предклинье (Liang et al., 2008). Причина таких изменений активно исследуется. Как одну из основных причин традиционно рассматривают потерю нейронов и/или синаптических контактов. Однако при исследовании гомогенатов тканей мозга для снижения влияния этих эффектов на полученные данные также было выявлено снижение потребления глюкозы (Swerdlow, 1994). Это позволяет предположить, что снижение потребления глюкозы обусловлено непосредственно снижением интенсивности аэробного гликолиза в клетках мозга.

Дисфункция митохондрий и оксидативный стресс, вызываемый повышенной генерацией АФК, являются двумя взаимозависимыми механизмами, которым отводится ключевая роль не только в старении мозга, но и в развитии БА. Основным источником АФК в клетке являются митохондрии. В то же время, следует сказать, что, согласно ряду источников (Shimohama, 2000; Abramov, 2005), одним из значимых источников АФК в мозге, ответственных за развитие оксидативного стресса, могут являться клетки микроглии, участвующие в развитии воспалительных реакций. Эти клетки за счет фермента NADPH-оксидазы способны синтезировать значительное количество супероксид-радикала, являющегося сильным окислителем. В этом контексте примечательно, что для мозга пациентов с БА характерна активация провоспалительного ответа, тесно связанного с активацией микроглии (Querfurth and LaFerla, 2010).

В митохондриях АФК образуются преимущественно на комплексах цепи переноса электронов – на комплексе IV, при неполном восстановлении

кислорода, и на комплексах I и III, когда электрон, в силу избыточного восстановления гемов и железосерных кластеров, покидает белковый комплекс, что приводит к образованию супероксид-радикала, а в дальнейшем — пероксида водорода и наиболее токсичной формы АФК — гидроксил-радикала (Quijano C. et al., 2016). Образующиеся в ходе работы комплексов дыхательной цепи АФК локализуются в митохондриальном матриксе, где могут оказывать свое повреждающее действие на макромолекулы, в том числе и на мтДНК, вызывая мутации, способные еще больше усугублять митохондриальную дисфункцию – явление, которое лежит в основе сформулированной Харманом (Harman, 2009) митохондриальной свободнорадикальной теории старения. Важной особенностью образования АФК является то, что интенсивность этого процесса находится в прямо пропорциональной зависимости от интенсивности транспорта электронов по дыхательной цепи. Таким образом, в клетках метаболически активных тканей, включая мозг, закономерно и неизбежно образуется больше АФК по сравнению с клетками метаболически малоактивных тканей. По различным оценкам, 1-5% электронов, поступающих в дыхательную цепь, участвуют в образовании АФК (Wallace, Fan & Procaccio, 2010).

Изначально образующейся формой АФК является супероксид-радикал ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Это короткоживущая молекула – порядка микросекунд (Kehrer, 2000), которая может непосредственно повреждать находящиеся вблизи места ее образования макромолекулы, однако не может проникать через липидные мембраны (Stuart et al., 2014). Сам по себе супероксид-радикал не является сильным окислителем, однако он может вступать в реакции с образованием пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) – умеренно токсичной, но более стабильной АФК, способной проникать в органеллы, удаленные от места его образования. Супероксид-радикал также может вступать в реакцию с сигнальной молекулой NO (оксидом азота) с образованием токсичного пероксинитрит-радикала ( $\text{ONOO}^-$ ). При взаимодействии с фосфолипидами мембран АФК запускают цепную реакцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), в ходе которой

повреждается большое количество молекул клеточных мембран (Catalá, 2009). Наиболее токсичной формой АФК является гидроксил-радикал ( $\cdot\text{OH}$ ), образующийся из пероксида водорода в присутствии атома переходного металла. Гидроксил обладает крайне высокой реактивностью и может повреждать широкий спектр макромолекул клетки (Stuart et al., 2014).

В развитии нейродегенеративных заболеваний важная роль отводится ионам переходных металлов, в частности, железа, содержание которого в ткани головного мозга увеличивается с возрастом, причем у пациентов с БА – более существенно (Maunard et al., 2005). Также известна роль содержания в среде другого переходного металла – алюминия – в повышении риска развития БА (Bondy, 2010). Железо, как и другие переходные металлы, играет важную роль в образовании АФК — в его присутствии протекает реакция Фентона, в ходе которой сравнительно малотоксичный пероксид водорода преобразуется в крайне реактивный гидроксил-радикал. В организме железо содержится в качестве простетических групп во множестве белков, в том числе в железосерных кластерах звеньев цепи переноса электронов митохондрий. Замечено, что не собранные в рабочие комплексы свободные субъединицы цепи переноса электронов способствуют повышенному образованию АФК (Miwa et al., 2014). Митохондрии являются основным местом синтеза железосерных кластеров, который происходит с участием фермента ISCU1 (Shi et al., 2010). Полиморфизм H63D в гене белка HFE, участвующего в транспорте железа в клетку, способствует избыточному накоплению железа в тканях. Согласно эпидемиологическим исследованиям, существует прямая связь между наличием этого полиморфизма и риском развития болезни Альцгеймера и такого нейродегенеративного заболевания, как боковой амиотрофический склероз. Показано, что в европейской популяции доля людей с этим полиморфизмом составляет до 25% (Ali-Rahmani et al., 2014).

Вместе с тем оценка роли АФК в клетке и связи образования АФК с оксидативным стрессом осложняется необходимостью измерения генерации АФК в физиологических условиях, тогда как данные о повышенном

образовании АФК в патологии зачастую получены на изолированных митохондриях, в которых образование АФК измерялось вне клеточного контекста (Walsh, Shi, Remmen, 2014). Кроме того, ряд экспериментов показал парадоксальное увеличение продолжительности жизни у нематод, несущих мутации в субъединицах дыхательной цепи, которые приводят к повышенной генерации АФК их митохондриями (Munkacsy, 2014). Интересно также, что повышенное содержание маркеров оксидативного стресса было обнаружено у долгоживущих грызунов голых землекопов (Andziak et al., 2006).

Важно отметить, что в клетках в норме постоянно генерируется некоторое количество АФК, что не только не приводит к патологии, но и играет важную роль в регуляции клеточного гомеостаза. Предполагается, что концентрация АФК является «сенсором», посредством которого регулируется клеточный ответ на стресс. Кратковременное повышение АФК до уровней, не вызывающих значительных повреждений макромолекул, посредством редокс-чувствительных транскрипционных факторов увеличивает экспрессию систем репарации и контроля качества, повышая адаптивные резервы организма (Starkov, 2008; Ristow & Zarse, 2010).

Ввиду значительного повреждающего потенциала избыточных уровней АФК и их постоянной генерации в дыхательной цепи, для поддержания жизнеспособности клеток важна работа антиоксидантных систем, заключающаяся в контроле скорости генерации АФК в зависимости от внешних условий, а также их детоксикации. Клеточные антиоксиданты способны обезвреживать большинство образующихся АФК, как в ходе реакций молекул антиоксидантов с молекулами АФК (глутатион), так и в ходе ферментативной детоксикации АФК (каталаза, супероксид дисмутаза). Небольшая доля оставшихся АФК реагирует с различными макромолекулами клетки – белками, липидами, митохондриальной и ядерной ДНК. Пониженное содержание основных антиоксидантных ферментов, таких как каталаза, супероксид-дисмутаза 1 и митохондриальная супероксид-дисмутаза 2 является характерной находкой в *post mortem* образцах мозга пациентов с БА,



что может указывать на роль оксидативного стресса в патогенезе БА (Aksenov et al., 1998, Massaad & Klann, 2011).

Одним из основных механизмов регуляции скорости продукции АФК является изменение трансмембранного потенциала митохондрий. В физиологических условиях его значение составляет 130-150mV (Farkas et al., 1989), при превышении этого значения комплексы ЭТЦ теряют возможность эффективно транспортировать протоны в межмембранное пространство. В связи с этим происходит нарушение работы комплексов переноса электронов, их избыточное восстановление и нарушение тока электронов. В такой ситуации, при значительно повышенном трансмембранном потенциале, повышается вероятность преждевременного выхода электронов из ЭТЦ, прежде всего на комплексах I и III (Kadenbach, 2003; Gergely et al., 2002).

Важным звеном в регуляции генерации АФК посредством «принудительного» снижения трансмембранного потенциала являются митохондриальные белки-разобщители, являющиеся членами семейства митохондриальных белков-переносчиков (MCP – mitochondrial carrier proteins). Они локализуются во внутренней мембране митохондрий и представляют собой альтернативный АТФ-синтазе путь возвращения протонов по градиенту концентрации из межмембранного пространства в митохондриальный матрикс. Основываясь на аминокислотных последовательностях в этом семействе выделяют пять белков: UCP1 (термогенин), UCP2, UCP3, UCP4 и UCP5 (VMCP-1). UCP1 экспрессируется в бурой жировой ткани и обеспечивает образование тепла в ходе утилизации питательных веществ. UCP2 локализуется во множестве тканей, в том числе в ЦНС. UCP3 специфически экспрессируется в мышечной ткани. UCP4 и UCP5 считаются белками-разобщителями, специфически экспрессирующимися в ЦНС, однако степень их гомологии с остальными членами семейства составляет только 40% и их функциональная активность не вполне ясна. В то же время следует отметить, что выводы о функциональной активности всех разобщающих белков, кроме UCP1, сделаны на основании схожести их

последовательности с UCP1. Таким образом, точный механизм их функционирования остается предметом дискуссий. Тем не менее показано, что уровень UCP2 определяет скорость образования АФК: повышенная экспрессия UCP2 в ЦНС снижает образование АФК, защищает от клеточной гибели, способствует формированию противовоспалительного фенотипа клетками микроглии (Hass, Barnstable, 2016). Предполагается, что цитопротекторное действие белков-разобщителей, в частности, UCP2, может быть основано на эффекте «мягкого разобщения» (mild uncoupling) (Korshunov, Skulachev, & Starkov, 1997; Brand, 2000), в ходе которого сравнительно небольшое снижение трансмембранного потенциала достаточно для того, чтобы предотвратить образование АФК, но при этом не происходит существенного снижения синтеза АТФ.

Последнее время накапливаются данные, указывающие на ассоциированную с БА дисфункцию митохондрий, не связанную напрямую с генерацией АФК. Одним из самых широко описанных и последовательно обнаруживаемых митохондриальных дефектов при БА является снижение активности комплекса IV дыхательной цепи, которое часто обнаруживается у пациентов с этим заболеванием (Cardoso et al., 2004; Payne, Chinnery 2015). Интересно, что такие изменения обнаруживаются не только в ткани мозга, но и в других клетках, включая полученные от пациентов с БА фибробласты и тромбоциты (Morris et al., 2014b). Показано, что нарушение работы комплекса IV приводит к повышенному образованию АФК, снижает энергетический резерв клетки и нарушает энергетический метаболизм (Mutisya, Bowling, Beal, 1994).

Также в мозге пациентов с БА снижена активность некоторых митохондриальных ферментов, включая ферменты цикла Кребса –  $\alpha$ -кетоглутарата ( $\alpha$ -КДГ) и пируват-дегидрогеназы (ПДГ) (Gibson - 1988; Gibson - 1998; Sorbi - 1983). Интересно отметить, что активность ферментов второй половины цикла Кребса повышена у пациентов с БА (Gibson, Shi, 2010). Ряд исследователей связывает нарушения работы цикла Кребса и дыхательной

цепи с непосредственным токсическим действием Абета (Eckert et al., 2011). Мономеры и олигомеры Абета снижают активность ряда ключевых молекул, включая комплекс IV, ПДГ и  $\alpha$ -КДГ, а также нарушают импорт кодируемых в ядерном геноме митохондриальных белков. Последнее обстоятельство может частично объяснить, каким образом мутации в гене TOMM40 становятся факторами риска развития БА.

Как показано на культурах фибробластов от пациентов с БА и у людей с мутациями в гене PSEN-1, при БА снижены как количество, так и активность  $\alpha$ -КДГ, но не ПДГ (Eckert, Shmitt, Götz, 2011). В работе (Sorbi et al. 1983) обнаруженные в *post mortem* образцах мозга пациентов с БА признаки нарушения холинергической синаптической передачи и снижение ацетил-КоА связываются со снижением содержания ПДГ, АТФ-цитрат лиаза и ацетоацетил-КоА тиолазы. При этом отмечено, что степень снижения активности окислительного фосфорилирования пропорциональна проявлению симптомов БА.

Обнаружен ряд характерных для БА особенностей мтДНК. Так, количество неповрежденной мтДНК в мозге пациентов снижено, тогда как количество локализуемых в аутофагосомах мтДНК, также как и митохондриальных белков, повышено. Определен ряд соматических мутаций мтДНК – прежде всего делеций, а также ряд точечных мутаций – которые потенциально возникают в ходе онтогенеза. В митохондриях мозга при БА существенно выше встречаемость так называемой 5кб-делеции — типичного возраст-ассоциированного повреждения кольцевой митохондриальной ДНК, заключающегося в вырезании участка длиной в 4977 нуклеотидов (у людей), включающего гены ND5, ND4, ND4L, ND3, COIII, ATP8 и ATP6, а также гены тРНК для пяти аминокислот (Phillips et al., 2014). Подобная делеция, включающая гомологичный участок мтДНК, описана также у других видов животных, включая крыс, у которых ее протяженность составляет 4834 пары нуклеотидов.

Митохондрии клетки являются динамическими структурами, структурно-функциональное состояние которых определяется процессами биогенеза, деления, слияния и митофагии. Процессы слияния и деления, коллективно называемые митохондриальной динамикой, определяют форму и размер отдельных митохондрий. Процессы митохондриальной динамики играют важную роль в транспорте митохондрий в клетке, перераспределении поврежденных белков и молекул митохондриальной ДНК и регуляция размера митохондрий. Размер митохондрий тесно связан с их функцией – крупные митохондрии более устойчивы к повреждениям за счет большей емкости при накоплении трансмембранного потенциала, эффекта разбавления получающих повреждения макромолекул и возможности компенсации функции при накоплении повреждений в одном из участков крупной митохондрии, а также в силу невозможности захвата крупной митохондрии фагофором для последующей митофагии. В то же время мелкие митохондрии быстро накапливают поврежденные молекулы, теряют трансмембранный потенциал и подвергаются деградации (Tatsuta, Langer, 2008). Поскольку в клетке действуют два противоположных процесса – слияние и деление, размер митохондрий определяется соотношением интенсивности каждого из этих процессов. Избыточное и стойкое смещение баланса в любую сторону приводит к нарушению функции клетки, однако многие нейродегенеративные состояния характеризуются смещением баланса в сторону деления, вследствие чего совокупность митохондрий клетки представлена большим количеством мелких сферических митохондрий. Митохондриальная динамика также связана с контролем качества этих органелл. В ходе процессов митохондриального деления происходит сортировка молекул – поврежденные белки и ДНК преимущественно направляются в одну из дочерних митохондрий. В дальнейшем такие митохондрии извлекаются из общего митохондриального пула в ходе процесса митофагии (Tatsuta, Langer, 2008).

Нарушение митохондриальной динамики занимает важное место в развитии БА и выявляется как в нейронах и фибробластах пациентов с БА, так

и в ряде клеточных моделей, у трансгенных животных - моделей БА, а также и при других нейродегенеративных заболеваниях. Важным направлением в исследовании митохондриальной динамики является оценка содержания в клетке основных белков, непосредственно участвующих в делении (Drp1, Fis1) и слиянии митохондрий (Mfn1/2, Opa1). В мозге пациентов с БА *post mortem* выявлено изменение экспрессии генов, кодирующих основные белки митохондриальной динамики - деления (*DRP1, FIS1*) и слияния (*MFN1, MFN2, OPA1, TOM40*) (Manczak et al., 2011). В фибробластах, полученных от пациентов с БА, было выявлено снижение уровня белка Drp1, являющегося регулятором митохондриального деления (Wang et al., 2008a), тогда как уровень другого регулятора деления Fis1 был повышен (Wang et al., 2008b). Кроме того, нитрозативный стресс, вызванный накоплением Аβета, может приводить к нитрозилированию Drp1. В свою очередь, нарушение митохондриальной динамики сопровождается повышением экспрессии гена APP. Помимо регуляции энергетического статуса клетки и участия в контроле качества митохондрий, процессы митохондриальной динамики участвует в транспорте митохондрий в клетке, в частности, формируя органеллы, способные транспортироваться по нейрональным отросткам (Sheng, Cai, 2012). В результате нарушение митохондриальной динамики способствует истощению количества митохондрий в аксонах и дендритах, что может играть важную роль в развитии синаптической недостаточности при БА. В целом, митохондрии мозга при БА, как и при ряде других нейродегенеративных заболеваний, преимущественно демонстрируют сдвиг митохондриальной динамики в направлении деления, тенденцию к локализации митохондрий в теле нейронов и сниженный транспорт в отростки и снижение уровня мРНК основного регулятора биогенеза митохондрий PGC1α.

В то же время нарушение митохондриальной динамики может заключаться не только в снижении активности одного из ее процессов, но и в нарушении молекулярных механизмов их протекания. Так, Zhang и соавт. (Zhang et al., 2016) обнаружили в нейронах мозга пациентов с БА и мышей -

моделей БА ранее не описанный митохондриальный фенотип, представленный удлинёнными митохондриями (более 10 мкм.), в которых чередуются участки нормальной толщины и значительно суженные участки (порядка 60 -100 нм.). Появление таких структур, названных “митохондриями на нитке” (“mitochondria-on-a-string” – MOAS), авторы связывают с незавершённым делением. Образование MOAS в результате остановки деления, которое также наблюдалось в мозге мышей дикого типа в ответ на гипоксию и в мозге старых животных, авторы рассматривают как направленную на выживание нейронов компенсаторную реакцию на энергетический дефицит, обеспечивающую защиту от митофагии. В то же время другой коллектив авторов (Morozov et al., 2017) рассматривает такие митохондрии, выявленные в коре мозга старых макаков-резус, как связанное со старением нарушение процесса динамики митохондрий, следствием которого становится нарушение аксонального транспорта (Youle, Van Der Bliek, 2012). Таким образом, вопрос о значении выявленного феномена остается открытым и требующим дополнительного исследования на различных моделях.

Еще одним местом пересечения функции митохондрий и синтеза бета-амилоида являются мембраны, ассоциированные с митохондриями (МММ). МММ — это динамически образующиеся регионы ЭПР, способные вступать в контакт с митохондриями благодаря белковому комплексу ERMES (endoplasmic reticulum–mitochondria encounter structure). Известно, что у дрожжей этот комплекс образован белками Mdm10, Mdm34, Mdm12, Mmm1 (Murley, Nunnari, 2016), однако у животных его молекулярная природа остается мало исследованной. МММ играют важную роль в транспорте фосфолипидов в митохондрии, а также в регуляции уровня кальция и процессов митохондриального деления. МММ включены в крупномасштабную функциональную систему, регулирующую архитектуру крист и взаимодействие митохондрий с ЭПР, называемую ERMIONE (ER-mitochondria organizing network) (van der Laan et al., 2012). Ряд исследований показывает, что МММ также являются местом синтеза Аβ в ходе разрезания белка-

предшественника APP, откуда Аβета может немедленно транспортироваться в митохондрии через митохондриальные транслоказы (Schon, Area-Gomez, 2013, Vance, 2014), где способен оказывать свое токсическое действие на различные молекулярные процессы (Pinho, 2014).

Группой Swerdlow выдвинута гипотеза митохондриального каскада, связывающая накопление бета-амилоида, также, как и клинические проявления болезни Альцгеймера, с предшествующей этим событиям дисфункцией митохондрий (Swerdlow et al., 2014). Известно, что бета-амилоид может накапливаться в ЭПР, митохондриях, эндосомах, аппарате Гольджи и ядре (Penke et al., 2012). Как уже упоминалось, показано, что бета-амилоид способен нарушать работу митохондрий, проникая в их матрикс. Таким образом, патологическое накопление внутриклеточного бета-амилоида и его олигомеров может приводить к еще большему нарушению функции митохондрий, запуская порочный круг. Дальнейшая разрегуляция внутриклеточного гомеостаза обуславливает гиперфосфорилирование тау-белка, дисфункцию синапсов и гибель нейронов.

Таким образом, в настоящее время накоплены убедительные доказательства того, что нарушения работы митохондрий и связанное с ними развитие энергетического дефицита может предшествовать развитию БА. Несмотря на то, что природа причинно-следственных связей между нейродегенерацией, митохондриальной дисфункцией и оксидативным стрессом остается неясной, митохондрии рассматриваются как одна из наиболее перспективных мишеней для вмешательства на ранних этапах развития заболевания, когда еще не произошли необратимые изменения ткани головного мозга. В связи с этим остро стоит вопрос о необходимости разработки и исследования препаратов, способных предупреждать и/или смягчать ассоциированные со старением и развитием нейродегенеративных процессов структурно-функциональные изменения митохондрий.

#### **1.4. Антиоксиданты в профилактике и лечении БА. Перспективы использования адресованных в митохондрии молекул**

Закономерно, что после выявления в мозге пациентов с БА повышенного содержания маркеров оксидативного стресса и нарушений функций митохондрий (Swerdlow, 2012) большие надежды возлагались на антиоксиданты – их способность замедлять развитие заболевания. В экспериментах на животных - моделях БА было показано, что в ряде случаев применение антиоксидантов способно повлиять на развитие некоторых ранних признаков БА, развивающихся до проявления клинических симптомов и напрямую связанных с накоплением Аβета, образованием внеклеточных амилоидных бляшек и гибелью нейронов. Среди таких антиоксидантов можно назвать витамин Е, витамин С, каротениоды и флавоноиды. Показано, что прием витамина Е снижает вызываемые Аβета образование АФК и нейротоксичность в культуре гиппокампальных нейронов крысы. Применение витамина Е также способно противодействовать развитию таупатии у мышей с избыточной экспрессией тау-белка (Nakashima et al., 2004) и накоплению Аβета с образованием бляшек у несущих мутантный ген APP мышей, но в последнем случае положительный эффект приема витамина Е отмечался только на ранних стадиях развития патологии (Sung et al., 2004). У пациентов с БА был обнаружен сниженный уровень витамина Е в плазме и спинномозговой жидкости (Gugliandolo, Bramanti, Mazzon, 2017). В то же время, результаты исследований эффективности витамина Е в профилактике и лечении БА противоречивы. В исследовании (Sano et al., 1997) было показано, что прием витамина Е пациентами на ранних клинических стадиях БА способен отдалить наступление ряда ключевых событий, отражающих тяжесть заболевания, таких как потеря способности к самообслуживанию и смерть, однако прием витамина Е не сказывался на скорости снижения когнитивной функции. Другое исследование показало замедление прогрессии заболевания при приеме пациентами с БА с легкой и умеренной степенью нарушений (Dysken et al., 2014). С другой стороны, трехлетнее исследование пациентов на



доклинической стадии БА – умеренных когнитивных нарушений (mild cognitive impairment, MCI) – не выявило эффекта препарата на время перехода MCI в клиническую БА. Вместе с тем, эпидемиологическое исследование, проведенное на общей популяции, продемонстрировало, что продолжительный прием витамина Е связан с повышенной заболеваемостью сердечно-сосудистыми заболеваниями (Dotan et al., 2009).

Известно, что витамин С также обладает антиоксидантной активностью. В эксперименте с внутрибрюшинным введением витамина С трансгенным мышам, экспрессирующим мутантные белки APP и PSEN1, показано замедление развития нарушений памяти и способности к обучению, но не выявлено улучшения нейропатологического состояния ткани мозга (Harrison et al., 2009).

Флавоноиды – один из классов растительных полифенолов – также рассматриваются как потенциальные активные вещества, способные влиять на течение БА. Такое действие может быть обусловлено как их антиоксидантной активностью (Darvesh et al., 2010), так и альтернативными путями: противовоспалительным действием (Sawicki et al., 2017), влиянием на активность сиртуинов и клеточную передачу сигналов (Jayasena et al., 2013). Так, в эндотелиальных клетках больных с БА прием полифенольного соединения ресвератрола снижал генерацию АФК и содержание маркера оксидативного стресса малонового диальдегида (Russo et al. 2003). Ксантоны - полифенолы растительного происхождения - также способны снижать образование АФК, активировать антиоксидантные системы и восстанавливать трансмембранный потенциал митохондрий (Campos-Esparza et al. 2009). В качестве мишени действия флавоноидов в мозге пациентов с БА рассматриваются астроциты – тип глиальных клеток, обеспечивающих структурную, метаболическую и трофическую поддержку нейронов, которые являются важным звеном в патогенезе БА (Nones et al., 2010).

В общем случае можно говорить, что в то время как недостаток антиоксидантов усугубляет признаки БА, их применение в больших дозах с

высокой достоверностью не способствует снижению выраженности признаков заболевания, и, согласно ряду исследований, может даже приводить к увеличению смертности (Issac, Quinn, Tabet, 2008). Важно также отметить, что действие веществ, применяемых в качестве антиоксидантов, может не ограничиваться их способностью снижать образование АФК или способствовать их детоксикации. В частности, показано, что недостаток витамина Е влияет на экспрессию в гиппокампе ряда генов, связанных с метаболизмом гормонов, фактором роста нервов NGF, апоптозом, дофаминэргической передачей сигнала, разрушением Аβета и конечных продуктов гликирования (Rota et al., 2005).

В контексте митохондриальных патологий представляет интерес технология адресной доставки лекарственных веществ непосредственно внутрь этих органелл. Принцип заключается в прикреплении малой молекулы лекарственного вещества к липофильному катиону, например, трифенилфосфоню, который, попав в клетку, концентрируется в митохондриях за счет того, что они являются единственными отрицательно заряженными органеллами. Вследствие такой адресной доставки внутримитохондриальная концентрация этих веществ в тысячи раз превышает цитоплазматическую.

Таким образом, в качестве возможной причины отсутствия позитивных результатов при использовании антиоксидантов называется их недостаточная способность проникать в митохондрии, а адресная доставка в них веществ, обладающих антиоксидантной активностью, рассматривается как перспективная стратегия разработки эффективных способов профилактики и влияния на течение БА, а. Одним из первых таких препаратов стал пластохинонил-децил-трифенилфосфоний (SkQ1), доставляющий в митохондрии высокоактивный антиоксидант пластохинон, способный после своего окисления в ходе деактивации активных форм кислорода многократно регенерироваться (Скулачев и др., 2008; Skulachev, 2013).

Следует отметить, что хотя молекулы SkQ1 обладают антиоксидантной активностью, одним из возможных физиологических механизмов действия направленных в митохондрии препаратов с гидрофобным катионом с делокализованным зарядом (SkQ1, MitoQ, C<sub>12</sub>TPP) может являться их разобщающая активность, обусловленная способностью линкерных молекул перемещаться внутри мембраны, способствуя транспорту протонированных и депротонированных жирных кислот с одной стороны мембраны на другую по механизму “flip-flop” (Severin et al., 2010). Такое действие может являться субстратом для «мягкого разобщения» митохондрий, позволяющего клеткам предотвращать гиперполяризацию митохондрий и ассоциированное с ней патологическое повышение генерации АФК за счет небольшого снижения синтеза АТФ (Plotnikov et al., 2012).

В настоящее время постановка диагноза и начало лечения БА происходят на этапе далеко зашедших изменений, когда радикальное вмешательство в развитие заболевания уже невозможно. Таким образом, имеет место недостаток высоконадежных методов диагностики, заблаговременно выявляющих самые ранние стадии развития болезни Альцгеймера, когда патологические изменения еще не набрали критическую массу и не стали необратимыми. Этот факт мог сыграть свою роль и в том, что, несмотря на множество попыток создания экспериментальных препаратов, не было разработано действенной патогенетически обоснованной терапии, которая бы обращала вспять или замедляла прогрессирование заболевания.

## **2. Биологические модели БА**

Создание и характеристика биологических моделей социально значимых заболеваний человека – практически единственно возможный подход к выяснению молекулярно-генетических механизмов их патогенеза и разработке новых способов лечения и профилактики. Такой подход особенно актуален при исследовании связанных со старением нейродегенеративных заболеваний в связи с тем, что их исследование у людей осложнено началом в позднем

возрасте, невозможностью исследовать у людей ранние доклинические стадии заболевания, связанными с качеством жизни различиями в его течении различиями, а также и с тем, что взятие образцов пораженной ткани возможно, как правило, только *post mortem*.

Использование биологических моделей заболеваний является критическим этапом в разработке лекарств и методик лечения. Цель создания животных моделей заключается в том, чтобы наиболее точно воссоздать различные аспекты заболевания – таким образом, что полученные на животной модели данные могут быть перенесены в клиническую практику.

В последние годы лавинообразно нарастает количество генетических моделей, среди которых доминируют моногенные: это или животные с нокаутом генов, или животные с определенными мутациями, ассоциированными с наследственными формами заболеваний у людей. Такой подход позволяет приблизиться к пониманию вклада конкретного гена в развитие признака, но не воспроизводит фенотипические проявления комплексных заболеваний полигенной природы, к которым относятся все ассоциированные со старением заболевания, включая БА.

Необходимость использования биологических моделей заболеваний, затрагивающих ЦНС, получила широкое признание несколько десятилетий назад. Первые модели были созданы в 1980х на основании ацетилхолиновой гипотезы, отводившей основную роль в патогенезе угнетению холинергической передаче сигнала и последующей гибели холинергических нейронов (Ksir, Venson, 1983). Совместно с ними на основе данных о том, что контакт с соединениями алюминия является фактором риска развития БА, были созданы модели, основанные на интоксикации алюминием (Rabe et al., 1982).

На данный момент большинство доступных животных моделей БА представляют собой линии трансгенных мышей, несущих одну или несколько мутаций, обнаруженных в человеческой популяции и ассоциированных с развитием ранней семейной формы БА. Предпосылкой этому послужила

сформулированная в начале 1990х годов на основе генетических исследований пациентов с ранней формой БА гипотеза амилоидного каскада, отводящая основную роль в патогенезе БА накоплению токсических форм бета-амилоида. Несмотря на ряд преимуществ использования крыс в исследовании нейродегенеративных заболеваний, эти животные редко используются в качестве основы для трансгенных моделей. Прежде всего это связано с тем, что технология трансгенеза млекопитающих была изначально разработана для мышей и ее применение на крысах было сопряжено с рядом методологических трудностей (Charreau et al., 1996). Со временем прогресс в понимании молекулярных механизмов оплодотворения и раннего развития эмбрионов – в том числе особенностей этих процессов у крыс – привел к созданию линий трансгенных крыс, первая из которых появилась в 2004 году (Ruiz-Oprazo et al., 2004). В дальнейшем был создан ряд линий трансгенных крыс, экспрессирующих ряд мутаций APP. Такие модели, однако, как и линии трансгенных мышей, демонстрируют мозаичность воспроизведения признаков БА (Do Carmo, Cuello, 2014).

### **2.1. Генно-модифицированные модели БА**

В целях исследования БА были созданы различные трансгенные модели, воспроизводящие ряд признаков заболевания. Основной методикой создания таких линий является встройка генов, связанных с развитием наследственной формы БА, несущих мутации, обнаруженные в человеческой популяции, либо мутантных генов, продукты которых играют важную роль в патогенезе БА. Прежде всего это линии мышей, экспрессирующих человеческий APP, несущий одну или несколько мутаций (TgAPP<sup>swe</sup>, hAPP695, PSAPPTg478/Tg1116/Tg11587), гиперэкспрессирующие человеческий таубелок (SHR318, SHR24) или совмещающие одну из этих мутаций с мутацией секретаз (например, модель TgF344-AD — человеческий APP, несущий мутацию APP Swe и ген пресенилина 1, несущий мутацию Δ9). Также созданы линии, воспроизводящие таупатию, характеризующиеся нарушением

поведения и воспроизводящие иные признаки БА, однако по этим параметрам у большинства линий наблюдается та или иная степень мозаичности, отдаляющая их от пациентов с БА. Начиная с 2004 года был создан ряд линий трансгенных крыс, у которых признаки БА воссоздаются по схожему принципу. Преимуществами крысиных моделей является более высокая схожесть физиологии крыс с человеческой, большая сложность когнитивных процессов, облегчающая исследование поведения, а также более крупные размеры животных, что облегчает селективное изучение различных участков мозга (Lecanu, Paradoroulos, 2013). В то же время, как и в случае мышинных моделей, большинство созданных на данный момент животных моделей демонстрируют мозаичность воспроизведения признаков БА – ни одна из этих линий не воспроизводит в точности симптомы и гистологические изменения БА у людей (Eckert, 2011). В частности, у большинства трансгенных животных не наблюдается образования нейрофибриллярных клубков в коре и гиппокампе. У трансгенных крыс SHR24, формирующих нейрофибриллярные клубки, не наблюдается такого значимого признака БА, как гибель нейронов в коре (Do Carmo, Cuello, 2014). При том, что трансгенные линии животных воспроизводят раннюю, или семейную форму БА, накапливается все больше данных, убеждающих в различиях молекулярно-клеточных механизмов патогенеза наследственной и спорадической форм заболевания (Swerdlow, 2014).

Таким образом, хотя трансгенные модели, созданные на основе мутаций, обнаруженных у пациентов с семейной формой БА, позволили глубже понять механизм развития заболевания, они не позволяют проводить исследования этиологии и патогенеза спорадической формы заболевания, проводить поиск продуктивных подходов к ее профилактике и лечению у людей.

## **2.2. Нетрансгенные модели БА**

В связи с недостатками трансгенных моделей БА существует потребность в линии животных, у которых патология, подобная БА, развивалась бы

спонтанно. У ряда животных с возрастом развиваются схожие с БА изменения головного мозга. Так, у собак в позднем возрасте имеют место образование амилоидных бляшек, гибель нейронов и поведенческие изменения (Head, 2013). У дэгу, грызунов семейства *Octodontidae*, обнаружено увеличение с возрастом содержания Аβета, образование нейрофибриллярных клубков и нарушение когнитивных функций (Inestrosa et al., 2005). Перспективным считается изучение БА-подобной патологии у приматов, включая макак резус и шимпанзе (Paspalas, 2017), поскольку такие модели теоретически позволяют изучать патогенез признаков БА на организмах, максимально приближенных к человеку. В то же время описанные выше виды характеризуются сравнительно большой продолжительностью жизни (более 10 лет у макак резус, до 60 лет у шимпанзе), что снижает их применимость как модельных организмов для исследования ассоциированных с возрастом заболеваний.

Другой стратегией создания биологических моделей БА является введение животным агентов, провоцирующих развитие признаков заболевания. В частности, для воссоздания признаков БА используется введение внутрь желудочков мозга или непосредственно в ткань мозга (в гиппокамп или префронтальную кору) различных форм Аβета – растворимой формы ( $A\beta_{1-40}$  или  $A\beta_{1-42}$ ), олигомеров или препаратов, полученных из внеклеточных бляшек пациентов с БА. Считается, что такое вмешательство приводит к запуску «амилоидного каскада», увеличению образования собственного Аβета, а затем к гиперфосфорилированию тау-белка, нарушению синаптической передачи и гибели нейронов. Такой подход позволяет получить патологический фенотип за сравнительно небольшое время – так, хроническое внутрижелудочковое введение Аβета обычно проводится в течение 2-8 недель (Lecanu, Papadopoulos, 2013). Недостатком такого подхода является нефизиологичность вмешательств, которые не отражают процесс образования различных форм Аβета в клетках и его локализацию при БА.

В качестве одной из перспективных нетрансгенных моделей рассматривается линия мышей SAMP (senescence accelerated mice),

полученная путем отбора по раннему развитию ряда ассоциированных со старением признаков, включающих снижение двигательной активности, выпадение шерсти, искривление позвоночника и раннюю смертность (Takeda, 2009). Линия мышей SAMP делится на ряд сублиний, в каждой из которой выражены разные аспекты возраст-ассоциированных патологий. У ее сублиний SAMP8 и SAMP10 патология нервной системы и поведенческие изменения проявляются наиболее ярко (Takeda, 2009). Однако исследование нейродегенеративных заболеваний на мышах осложнено как сравнительно простым поведением, затрудняющим оценку изменения когнитивных способностей и исследование поведенческих изменений, так и малым размером животных, что обуславливает методологические сложности, связанные с выделением материала.

Недавно получены убедительные доказательства перспективности использования в качестве модели спорадической формы БА созданной в ИЦиГ СО РАН линии преждевременно стареющих крыс OXYS (Kolosova et al., 2009, Stefanova et al., 2010 -2018).

### **2.3. Крысы линии OXYS как модель спорадической формы БА**

Как показали исследования последних лет, уникальной генетической моделью спорадической формы БА является созданная в ИЦиГ СО РАН линия преждевременно стареющих крыс OXYS. История её создания (Колосова и др., 2014) берет начало в 70-е гг. XX в., когда селекцией и инбридингом крыс Wistar, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы, была создана сублиния W/SSM (Wistar Салганик–Соловьева–Морозкова), которую авторы позиционировали как модель наследственной галактоземии. В пяти первых поколениях развитие катаракты вызывали обогащенной галактозой диетой. В дальнейшем уже без нагрузки галактозой, сыгравшей, по-видимому, роль мутагена, у крыс, помимо катаракты, спонтанно развивались кардиомиопатия, сколиоз, эмфиземы, предраковые состояния и некоторые биохимические признаки галактоземии (Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И., 1975).



Но следует отметить, что анализ развития этих признаков был выполнен, в основном, на фоне нагрузки галактозой либо в ближайших последующих поколениях животных (Колосова и др., 2014).

Интерес к линии возрос после выявления методом электронного парамагнитного резонанса повышенной способности гомогенатов печени и миокарда генерировать АФК в ответ на добавление пероксида водорода (Salganik R. I. et al., 1994). Опираясь на эти результаты Р. И. Салганик зарегистрировал линию в международной базе RGD (Rat genome database) как линию OXYS с ключевой характеристикой «врожденная гиперпродукция радикалов кислорода». Тогда же у этих животных были выявлены и нарастающие с возрастом дисфункции митохондрий печени, которые рассматривались как одна из наиболее вероятных причин гиперпродукции радикалов кислорода и преждевременного старения крыс (Шабалина И. Г. и др., 1995). Действительно, митохондрии являются основным источником АФК в клетках, но оценка их генерации в митохондриях печени методами хемолюминесцентного анализа показала, что у крыс OXYS она даже ниже, чем у контрольных крыс Wistar (Меньшикова Е. Б. и др., 2002.). В дальнейшем также оказалось, что не все заявленные ранее свойства у крыс OXYS проявляются. Так, не было обнаружено признаков галактоземии, достаточно поздно развивалась катаракта (Колосова и др., 2014).

Для установления инбредного статуса и стабилизации фенотипических признаков в 58–63-м поколении крыс OXYS было проведено усиление отбора по признаку ранней спонтанной катаракты, что привело к её развитию уже в молодом возрасте (Колосова Н. Г. и др., 2003). Результатом усиления отбора явилось устойчивое спонтанное проявление комплекса признаков преждевременного старения в последующих поколениях. Сегодня имеется 112-е поколение крыс OXYS, у которых уже в молодом возрасте, помимо катаракты, развиваются ретинопатия, аналогичная возрастной макулярной дегенерации у людей (Жданкина и др., 2008; Markovets et al., 2011), остеопороз (Muraleva et al., 2012), ускоренная инволюция тимуса (Маркова и др., 2003) и

ускоренное старение мозга с характерными для БА признаками (Stefanova et al., 2014-2018).

В отличие от большинства трансгенных моделей, у крыс OXYS имеет место повышенное образование как амилоидных бляшек, так и нейрофибрилярных клубков на фоне усиленного накопления Аβета и фосфорилированного тау (Stefanova N. A. et al., 2015). В участках CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа крыс OXYS уже к возрасту 3-5 месяцев развиваются значительные структурные изменения в нейронах. Наиболее выраженные нейродегенеративные изменения возникают в участках CA1 и CA3. В возрасте 5 и 15 месяцев доля поврежденных нейронов и темпы их гибели существенно выше у OXYS по сравнению с крысами Вистар. Кроме того, размер тел пирамидальных клеток и их ядер в регионе CA1 существенно меньше по сравнению с крысами Вистар. К 15 месяцам нейродегенеративные изменения затрагивают все регионы гиппокампа (Stefanova et al., 2014). По данным магнитно-резонансной томографии у крыс OXYS к 3 месяцам наблюдается расширение латеральных желудочков, обнаруживаются очаги демиелинизации, к 12 месяцами также наблюдается сокращение объемов мозга (Stefanova et al. 2013), что является признаками, характерными для нейродегенеративных заболеваний человека. В поведенческих тестах у крыс OXYS в возрасте 3 месяца отмечается снижение исследовательской активности, повышение тревожности. С возрастом эти признаки продолжают прогрессировать (Stefanova et al., 2014).

Следует отметить, что все описанные изменения развиваются на фоне предшествующих изменений в митохондриях, затрагивающих их ультраструктуру (разрежение крист, лизис матрикса), уровень экспрессии митохондриальных белков и эффективность метаболизма, снижающих активность АТФ-синтазы.

Было замечено, что у крыс OXYS накопление бета-амилоида начинается в возрасте 13-18 месяцев, уже после развития поведенческих изменений (Stefanova et al, 2016). Это позволяет предположить, что ранние стадии БА-

подобной патологии у крыс OXYS могут быть связаны с развитием митохондриальных дефектов. Проведенный нами анализ результатов полученных ранее данных секвенирования транскриптома (RNA-seq) коры мозга крыс OXYS (Стефанова и др., 2015) показал, что у крыс OXYS повышена экспрессия генов UCP2 и UCP3, кодирующих разобщающие белки (неопубликованные данные). Разобщающие белки способны шунтировать ток протонов из межмембранного пространства в матрикс в обход АТФ-синтазы, рассеивая таким образом мембранный потенциал и снижая степень сопряжения окисления и фосфорилирования. Предполагается, что функцией данных белков может являться антиоксидантная защита, так как умеренное снижение мембранного потенциала существенно снижает темпы образования АФК на комплексах цепи переноса электронов.

Таким образом, имеются убедительные доказательства того, что у крыс OXYS спонтанно развиваются все ключевые признаки БА. Не вызывает сомнений, что как и у людей с БА, развитие этих признаков у крыс OXYS связано с дисфункцией митохондрий. Однако вопрос о вкладе структурно-функциональных изменений митохондрий в инициацию и развитие патологических молекулярных каскадов БА у крыс OXYS остается открытым. Для ответа на него представляется актуальным оценить структурные изменения митохондрий крыс OXYS и их функциональной активности на разных стадиях развития признаков БА, включая доклиническую.

### **3. Заключение**

К настоящему времени получены убедительные доказательства того, что дисфункция митохондрий играет важную роль в развитии спорадической формы БА, однако последовательность возникновения этих событий остается неясной. В то же время, ряд данных указывает на то, что развитие некоторых широко изучаемых признаков спорадической БА, таких как образование амилоидных бляшек и гиперфосфорилирование тау-белка, является сравнительно поздним событием по сравнению с развитием энергетической

недостаточности, тесно связанной с митохондриальной дисфункцией. Вместе с тем, в ряде экспериментов не было обнаружено прямой связи развития патологических изменений при БА с таким признаком митохондриальной дисфункции как избыточная продукция АФК, так же, как и замедления развития патологии при использовании антиоксидантов.

Наличие экспериментальной модели, достаточно точно отражающей развитие всех стадий заболевания и позволяющей проводить исследования в достаточно короткие сроки является необходимым этапом на пути к разработке высокоэффективной терапии. Выяснение роли дисфункции митохондрий в нейродегенеративных процессах у крыс OXYS не только поможет показать применимость линии для исследования болезни Альцгеймера, но и позволит пролить свет на самые ранние этапы развития патологии, когда можно ожидать наибольшего эффекта от медицинского вмешательства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Для исследования ультраструктурных изменений митохондрий нейронов брали самцов крыс линий Вистар (контроль) и OXYS (n=3) трех возрастов – 20 дней, 5 и 24 месяца, а также крыс в возрасте 24 месяца, получавших митохондриальный антиоксидант SkQ1 с кормом по 250 нмоль на кг массы тела с возраста 19 месяцев. Для определения содержания мономеров пептида бета-амилоида использовали крыс OXYS в возрасте 10 месяцев. Для измерения генерации АФК митохондриями мозга использовали самцов крыс линий Вистар и OXYS в возрасте 20 дней (n=5) и 3 месяца (n≥7). Для измерения содержания белка UCP2 использовали самцов крыс Вистар и OXYS возрастных групп 20 дней, 3 месяца и 18 месяцев, измерение проводили в коре (n≥4) и гиппокампе (n=6).

**Подготовка препаратов для электронной микроскопии.** Крыс усыпляли углекислым газом и декапитировали. Выделяли гиппокамп, из которого вырезали участки ткани кубической формы со стороной 1 мм, включающие пирамидный слой поля CA1. Выделенные фрагменты

гиппокампа фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом, постфиксировали тетраоксидом осмия и заливали в блоки смолы Epon 812. На микротоме выполняли поперечный полутонкий срез через всю толщину гиппокампа для изучения под световым микроскопом при окраске метиленовым синим. Основываясь на данных среза выбирали участок, соответствующий слою пирамидных нейронов зоны CA1, который в дальнейшем выделялся на блоке и использовался для изготовления ультратонкого среза (65 нм) на ультратоме LEICA ULTRACUT EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Ультратонкий срез контрастировали цитратом свинца и уранил-ацетатом и использовали для электронной микроскопии.

**Электронная микроскопия.** Препараты исследовали на электронном микроскопе JEM 100C (JEOL Ltd., Япония). В ходе электронной микроскопии производили съемку пирамидных нейронов зоны CA1 при увеличениях 2800x и 3500x таким образом, чтобы в кадр полностью попадало тело нейрона. На снимках с помощью программы ImageJ проводили оценку ультраструктуры митохондрий, подсчет количества и размера митохондрий, подсчет числа межмитохондриальных контактов, ядерно-митохондриальных контактов и контактов митохондрия-эндоплазматический ретикулум.

**Иммуногистохимическое исследование с помощью электронной микроскопии.** После выделения фрагменты гиппокампа фиксировали в 4% ПФА на 0,01M PBS и блокировали неспецифические эпитопы 1% БСА. Инкубировали с первичными антителами к пептиду бета-амилоида (ab10148, Abcam, Великобритания) и вторичными антителами (ab27234), конъюгированными с 10-нм наночастицами золота. В качестве контроля инкубировали ткань со вторичными антителами, без предварительной инкубации с первичными. В дальнейшем препараты постфиксировали тетраоксидом осмия и заливали в блоки смолы Epon 812.

**Выделение митохондрий.** Крыс наркотизировали галотаном и декапитировали, выделяли головной мозг, удаляли мозжечок и ствол мозга. Дальнейшие манипуляции проводили при +4°C, на льду. Выделенную ткань

перемещали в ледяную сахарозу и гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали в течение 7 минут при 1000 g. Надосадов переносили в отдельные пробирки и центрифугировали при 10800g в течении 12 минут. Надосадов сливали, осадок ресуспендировали в 15% растворе перколла в сахарозе, и наслаивали на двуслойный градиент перколла с концентрациями 23% и 40%. Центрифугировали при 31000g в течение 18 минут. Кольцо на границе раздела 23% и 40% перколла переносили в отдельные пробирки, ресуспендировали в сахарозе и отмывали при 16100g в течении 11 минут. Надосадов удаляли, осадок ресуспендировали в сахарозе и отмывали при 8500g в течение 11 минут. Надосадов сливали, осадок ресуспендировали в 350 мкл среды инкубации и переносили в 1.5 ml пробирки.

**Измерение количества белка** проводили методом спектрофотометрии с реактивом Бредфорда на спектрофотометре Agilent 8453 (Agilent Technologies, США) при максимуме поглощения 595 nm.

**Измерение продукции АФК.** Измерение кинетики продукции пероксида водорода проводили на аппарате Varian Cary Eclipse (Varian, США). В кюветы, содержащие пероксидазу хрена, Amplex Red (2 мМ) и комбинацию субстратов дыхания (глутамат (10мМ), малат (2мМ), пируват (2,5мМ), сукцинат (5мМ)), добавляли количество взвеси митохондрий, эквивалентное 50 мкг белка. В ходе реакции генерируемого пероксида водорода с пероксидазой и Amplex Red образуется флюоресцирующее вещество резорурфин с парой возбуждение/эмиссия 570/585 нм. Значение наклона кривой кинетики образования резорурфина, рассчитанное с помощью программного пакета Cary Eclipse Kinetics использовали для расчета темпов продукции пероксида водорода по формуле  $\frac{\Delta F \times k}{\Delta t \times Q_6}$  где  $\Delta F$  – наклон кривой,  $k$  – количество Amplex Red,  $\Delta t$  – время измерения,  $Q_6$  – количество белка. Результат выражался в пмоль  $H_2O_2$  / (мг<sub>белка</sub> \* мин).

**Измерение уровня UCP2.** Образцы ткани коры и гиппокампа, хранившиеся при -70С, гомогенизировали в PBS на льду, двукратно

соницировали (Vibra-Cell VCX 130, Sonics & Materials, США) и центрифугировали (5 мин. 5000g). В полученном супернатанте уровень белка UCP2 измеряли с помощью набора ELISA Kit for Uncoupling Protein 2, Mitochondrial (UCP2) SEC586Ra (Cusabio, КНР) в соответствии с инструкциями производителя. Данные нормировали на количество общего белка супернатанта.

**Выделение белка митохондриальной фракции.** Все этапы выделения белка производили при +4<sup>0</sup>C на льду. Образцы гиппокампов и префронтальной коры помещали в буфер (320 мМ сахарозы; 1 мМ ЭДТА; 0,01 М TrisHCl, pH 7,4) в соотношении 1:10 с добавлением ингибиторов протеаз (Protease inhibitor cocktail P8340 (Sigma-Aldrich)), измельчали ножницами и гомогенизировали электрическим гомогенизатором (#Z359971, Sigma, США) 3 мин. Гомогенаты центрифугировали на скорости 800 x g - 10 мин. Супернатант отделяли и центрифугировали при 15000 g - 20 мин. Осадок (митохондриальная фракция) ресуспензировали в 120 мкл лизирующего буфера (50 мМ трис-HCl pH 7,4; 150 мМ NaCl; 2 мМ ЭГТА; 0,2% Тритон-X; 0,3% NP-40), 30 мин инкубировали на льду и хранили при температуре -70<sup>0</sup>C до проведения исследования.

**Вестерн-блот анализ белков митохондриальной динамики.** Вестерн-блот анализ проводили на 54 интактных животных в возрасте 20 дней, 4 и 24 месяцев линий OXYS и Вистар (по 9 крыс в группе). Образцы митохондриальной фракции белка смешивали с 5X буфером для загрузки (10% SDS; 20% β-меркаптоэтанол; 50% глицерин; 0,3М трис-HCl pH 6,8; бром-феноловый синий), нагревали 15 минут при 95<sup>0</sup>C и наносили по 25 мкг общего белка на дорожки полиакриламидного геля (10% разделяющий, 5% концентрирующий) в трис-глициновом буфере (25 мМ трис-HCl; 190 мМ глицин; 0,1% SDS). Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-CEXtra, Amersham) проводили в камере для «влажного» переноса. Качество фореа и переноса контролировали оценкой флюоресценции триптофана с помощью 3-хлороэтанола. После переноса мембрану блокировали 5% БСА в PBST (0,01 М фосфатно-солевой буфер с 0,1%

Tween20). Далее мембраны инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре с первичными поликлональными антителами против DRP1 (1:1000, ab56788, Abcam, США), VDAC (1:1000, ab14734, Abcam, США), митофузина 1 (1:1000, ab57602, Abcam, США) и митофузина 2 (1:500, ab 50838, Abcam, США) в 5% БСА в PBST. После 3-х отмывок по 15 минут в PBST проводили инкубацию со вторичными антителами Goat Anti-Rabbit (1:5000, ab6721, Abcam, США) для детекции митофузина 1 и Sheep Anti-Mouse (1:5000, ab6808, Abcam) для детекции остальных белков в PBST в течение 2 часов при комнатной температуре. После 2-х отмывок на мембраны наносился ECL-реагент. Хемифлуоресцентное излучение детектировали с использованием рентгеновской плёнки. Интенсивность свечения бендов измеряли с помощью программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

**Ферментативная активность митохондриальных комплексов I, IV и V.** Активность фермента NADH дегидрогеназы (комплекс I) определяли набором реактивов Complex I Rodent Enzyme Activity Microplate Assay Kit (ab109721, Abcam, США) в соответствии с инструкциями изготовителя. Активность фермента цитохром с оксидазы (комплекс IV) определяли набором реактивов Complex IV Rodent Enzyme Activity Microplate Assay Kit (ab109911, Abcam, США) в соответствии с инструкциями изготовителя. Активность АТФ-синтазы определяли набором реактивов MitoTox Complex V OXPHOS Activity Assay Kit (ab109907, Abcam, США) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Для измерения активности в каждую лунку 96-луночного планшета с нанесенными антителами помещали 200 мкл гомогената ткани гиппокампа или префронтальной коры, содержащего 50 мкг общего белка и инкубировали при комнатной температуре 3 ч. Лунки промывали буфером дважды и добавляли 200 мкл реагента. Методом дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии на приборе CLARIO star (BMGLabtech, San-Diego, США) оценивали активность фермента на основании снижения оптической



плотности на длине волны 450 нм., 550 нм. или 340 нм. (комплексы I, IV и V соответственно) один раз в минуту в течение 2 часов.

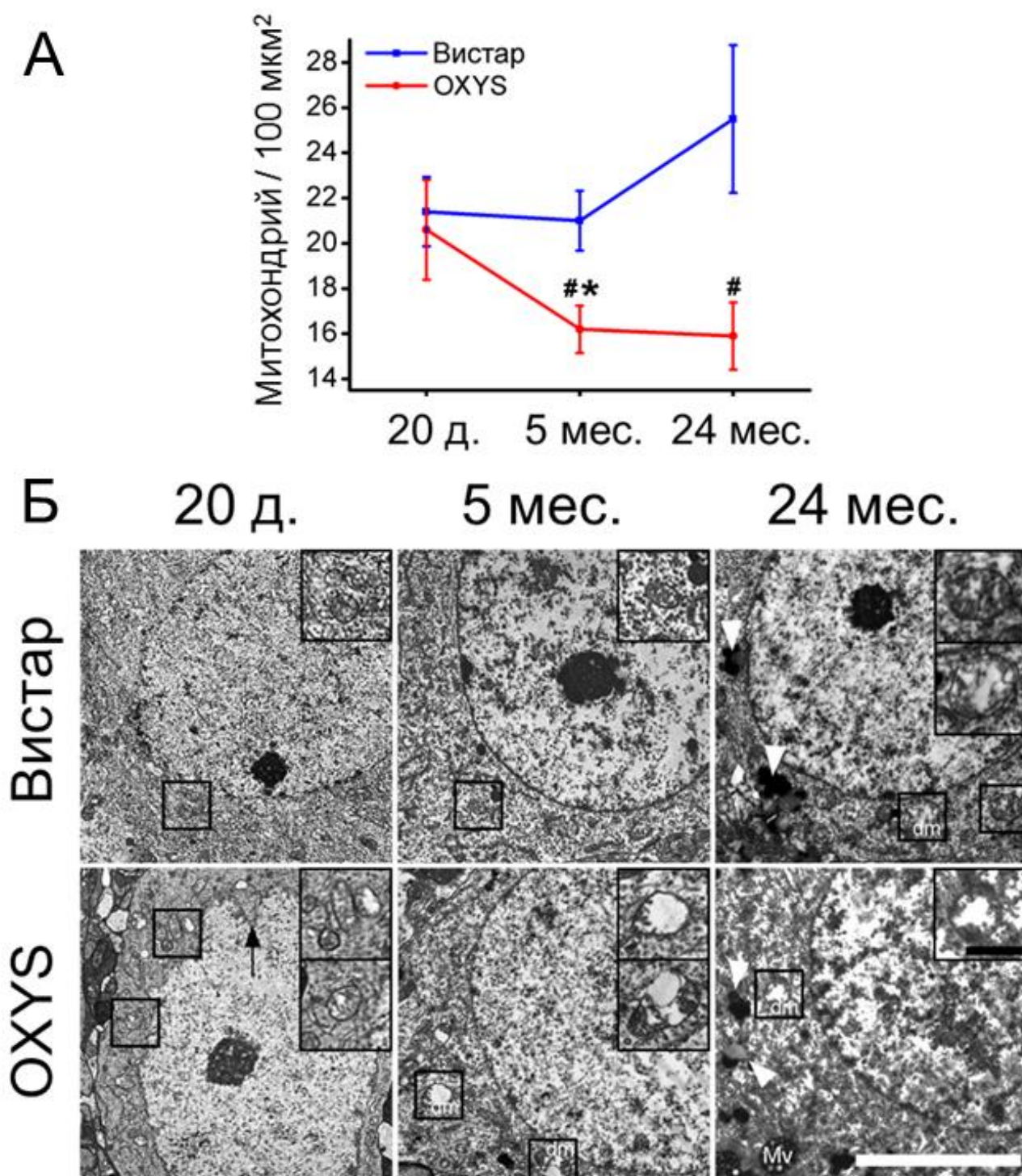
**Статистическая обработка.** Данные обрабатывали в программе STATISTICA 10 для выявления статистически значимых различий по учитывавшимся показателям. Использовали двухфакторный дисперсионный анализ и однофакторный дисперсионный анализ с последующими post hoc сравнениями групповых средних (Newman-Keuls test). Различие признавали значимым при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Изменения с возрастом морфологических параметров митохондрий пирамидных нейронов гиппокампа крыс OXYS

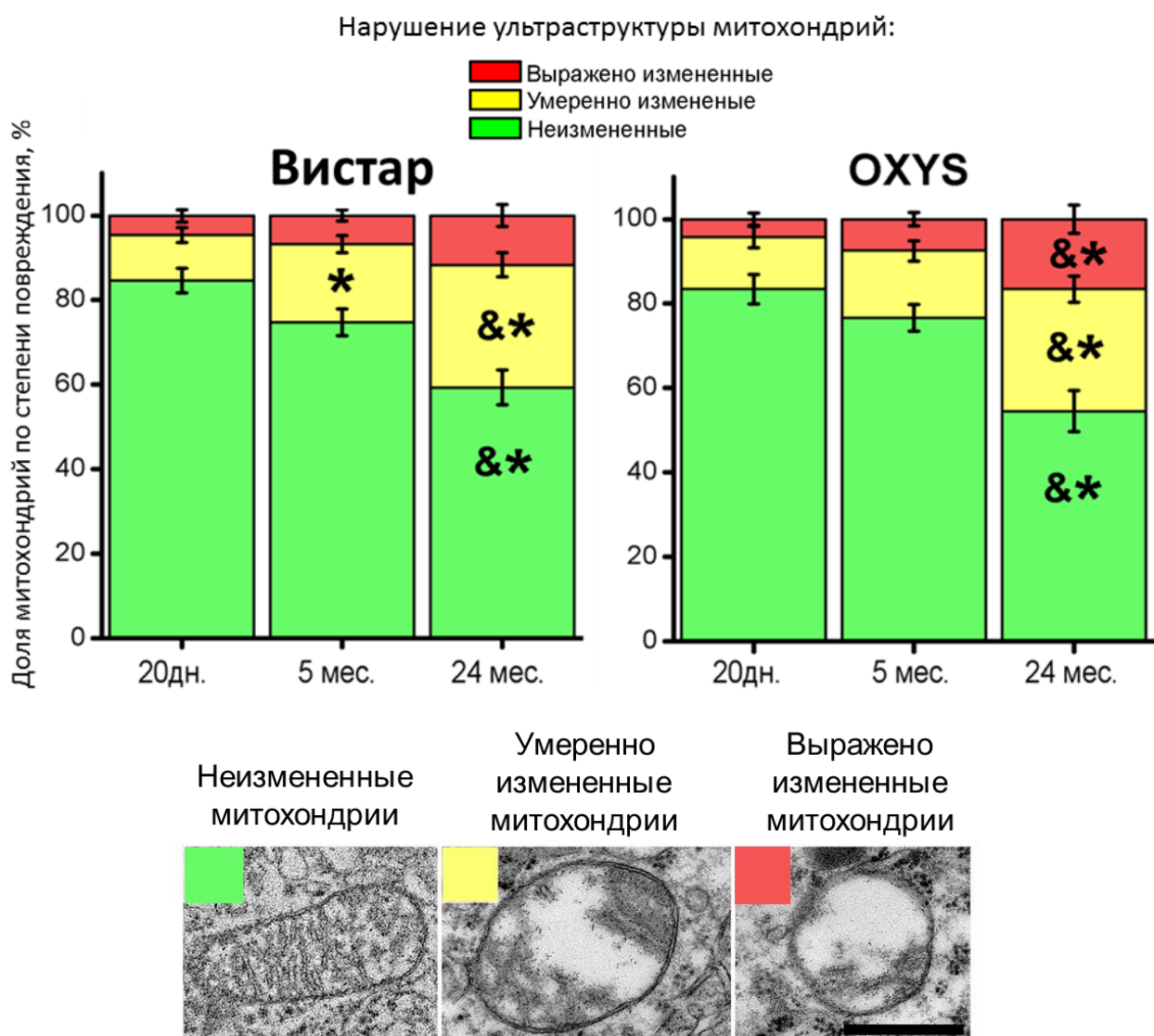
Изменения ультраструктуры митохондрий позволяют дать объективную оценку их функционального состояния в ткани на уровне отдельных клеток. Закономерности изменений ультраструктуры митохондрий с возрастом у крыс OXYS и Вистар изучали на популяции пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа в возрасте 20 дней, 5 и 24 месяцев, т.е. в период, предшествующий развитию у крыс OXYS признаков болезни Альцгеймера, в период их манифестации и в период, когда признаки заболевания уже ярко выражены (Stefanova et al., 2014, 2015).

Удельное количество митохондрий (рис. 2 А) отражает количество митохондрий в отдельном нейроне. Этот показатель зависел от генотипа и был ниже у крыс OXYS ( $F_{1,188} = 7.4$ ,  $p = 0.007$ ). При этом в возрасте 20 дней межлинейные различия отсутствовали. В 5 месяцев количество митохондрий в нейронах поля CA1 крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар было снижено на четверть ( $p = 0.0055$ ) и к возрасту 24 месяца это различие становилось двукратным ( $p=0.01$ ). После изначального снижения к возрасту 5 месяцев ( $p = 0.042$ ) удельное количество митохондрий у крыс OXYS оставалось сниженным.



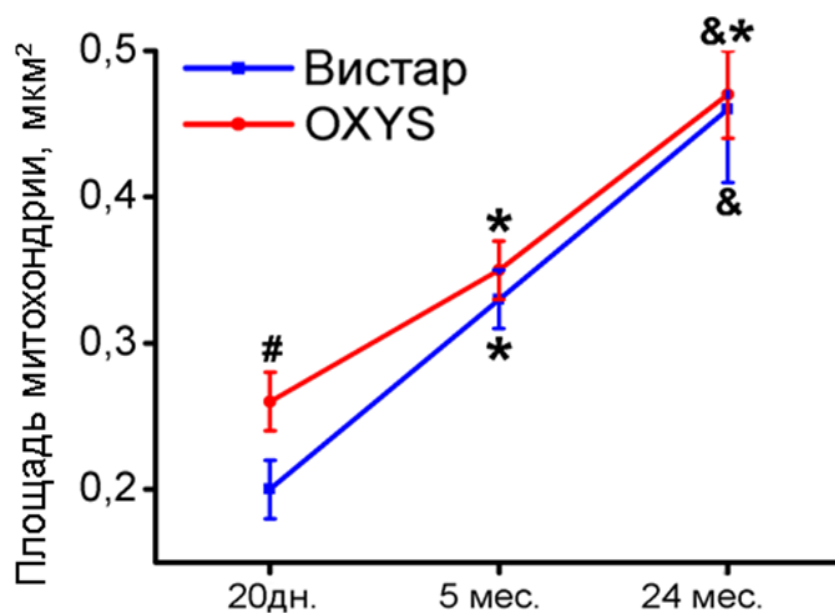
**Рис. 2.** Изменения с возрастом удельного количества митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS (А). Репрезентативные фотографии участков цитоплазмы пирамидных нейронов крыс Вистар и OXYS в различных возрастах и примеры митохондрий различной степени поврежденности (врезки) (Б). # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар, \* -  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим возрастом. Бар – 5 мкм. dm – поврежденные митохондрии. Mv – мультивезикулярное тельце. Белые стрелки – липофусцин. Черная стрелка – вдавление поверхности ядерной мембраны.

Для оценки структурно-функционального состояния митохондрий нейронов в поле СА1 гиппокампа крыс Вистар и ОХУС (рис. 3) рассчитывали удельное содержание неизменённых митохондрий, митохондрий с признаками умеренных деструктивных изменений (обводненный матрикс, частично фрагментированные кристы) и митохондрий с признаками выраженных деструктивных изменений (значительно обводненный матрикс с единичными кристами) (рис.2). Эти показатели зависели от возраста ( $F_{2,187} = 23.9$ ,  $p < 0.000001$ ,  $F_{2,187} = 21.2$ ,  $p < 0.000001$  и  $F_{2,187} = 9.26$ ,  $p = 0.00015$  соответственно). Удельное содержание неизменённых митохондрий снижалось у крыс Вистар и ОХУС к возрасту 24 месяца по сравнению с животными в возрасте 5 месяцев ( $p = 0.0036$  и  $p = 0.0003$  соответственно), а удельное содержание митохондрий с признаками умеренных изменений – увеличивалось ( $p = 0.0032$  и  $p = 0.0013$  соответственно). Важно отметить, что только у крыс ОХУС количество митохондрий с крайней степенью деструктивных изменений к возрасту 24 месяцев достоверно возросло ( $p = 0.0125$ ).



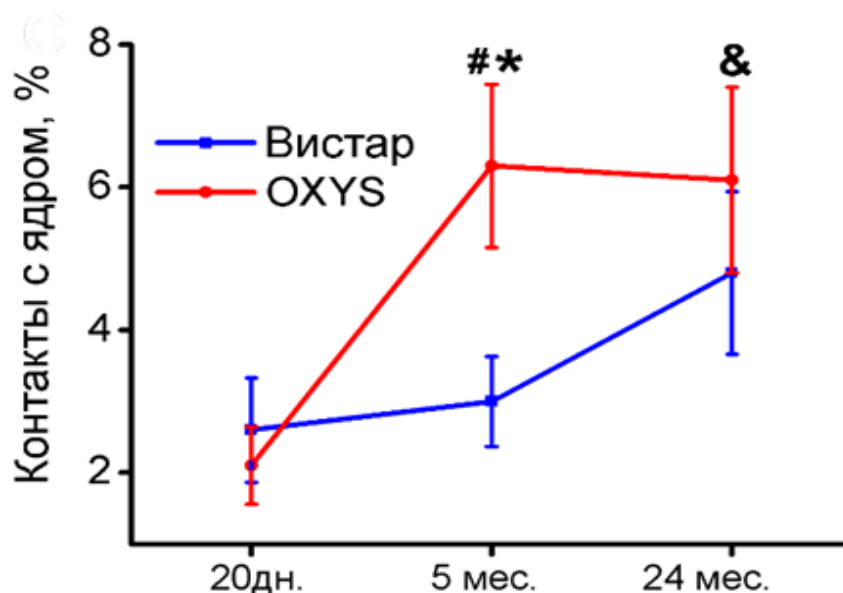
**Рис. 3.** Соотношения неизменных, умеренно поврежденных и выражено поврежденных митохондрий в нейронах поля CA1 гиппокампа крыс Вистар и OXYS разного возраста. # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар, \* -  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим возрастом, & -  $p < 0,05$  по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии.

Средняя площадь митохондрий (рис. 4) зависела от возраста ( $F_{2,187} = 23.7$ ,  $p < 0.000001$ ) и с возрастом увеличивалась у крыс обеих линий, но не зависела от генотипа. Однако в возрасте 20 дней у крыс OXYS этот показатель был на 30% выше, чем у крыс Вистар ( $0,26 \pm 0,02$  и  $0,2 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ , соответственно,  $p = 0.017$ ).



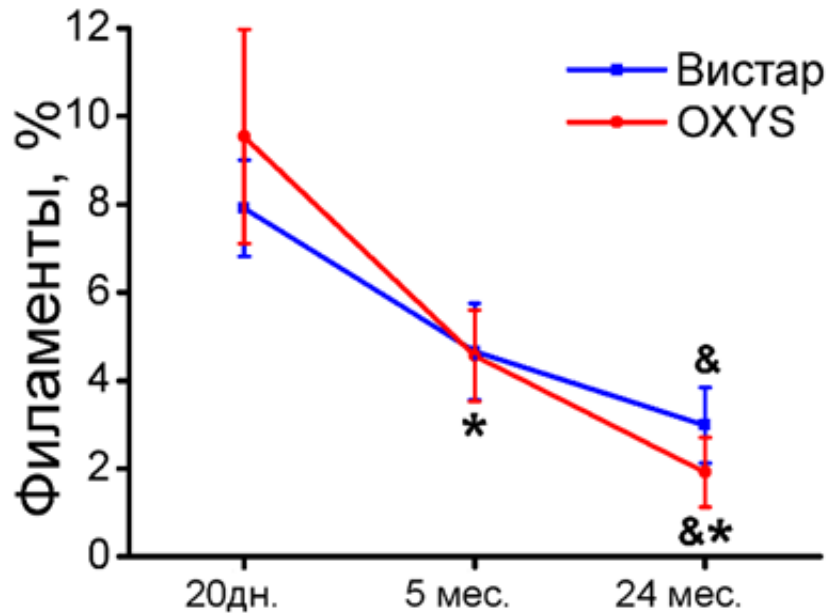
**Рис. 4.** Изменения с возрастом средней площади митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS. Данные представлены как средний размер митохондрии в мкм<sup>2</sup>. # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар, \* -  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим возрастом, & -  $p < 0,05$  по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии.

Поскольку митохондрии являются основным источником АТФ в клетке, их колокализация с различными структурами указывает на усиленное потребление энергии этими структурами. Так, количество митохондрий, прилежащих к ядру, отражает его повышенную потребность в энергии. Согласно результатам анализа количественной оценки контактов митохондрий с ядром (рис. 5), этот показатель с возрастом увеличивался, и был у крыс OXYS в возрасте 5 месяцев в 2 раза больше, чем у крыс Вистар ( $p = 0.011$ ). К возрасту 24 месяцев количество контактирующих с ядрами митохондрий в нейронах гиппокампа крыс OXYS становилось втрое больше, чем у 20-дневных крыс этой линии ( $p = 0.012$ ).



**Рис. 5.** Изменения с возрастом доли митохондрий, контактирующих с ядром, в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS. Данные представлены как процентное отношение количества митохондрий, участвующих в образовании контактов, к общему количеству митохондрий нейрона. # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар, \* -  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим возрастом, & -  $p < 0,05$  по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии.

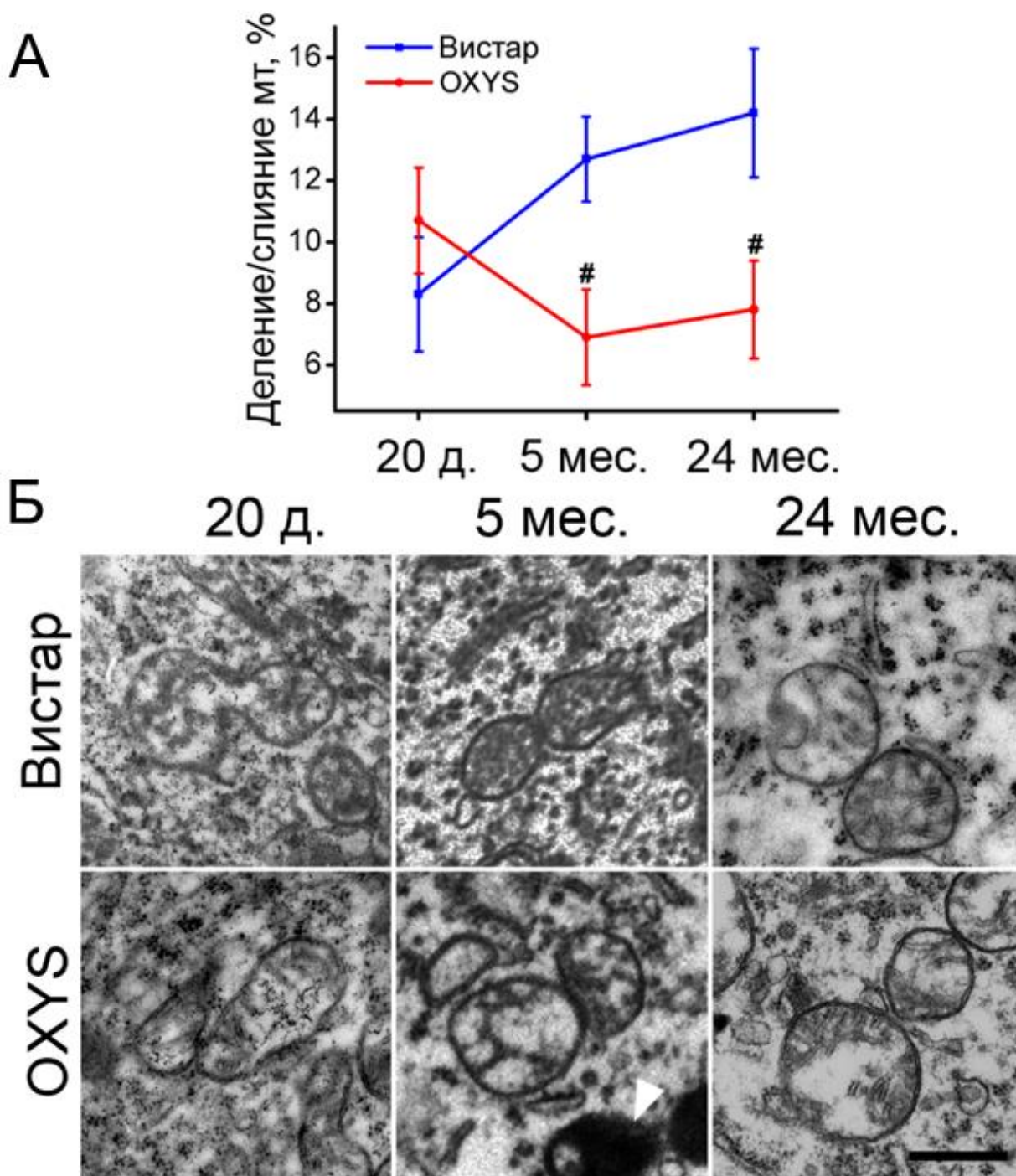
Митохондриальные филаменты — это значительно вытянутые, протяженные митохондрии, устойчивые к митофагии (в силу неспособности фагофора заключить крупную органеллу в аутофагосому) и снижению трансмембранного потенциала (благодаря большой суммарной площади внутренней митохондриальной мембраны и, соответственно, высокой емкости накопленного потенциала). Образование таких митохондрий связано со смещением баланса митохондриальной динамики в сторону слияния. Содержание таких митохондрий снижается с возрастом и при развитии ряда нейродегенеративных заболеваний. Количество митохондриальных филаментов (рис. 6) зависело только от возраста ( $F_{2,188} = 12.06$ ,  $p = 0.00001$ ), снижалось у крыс OXYS с 20 дней до 5 месяцев ( $p = 0.032$ ). По сравнению с возрастом 5 месяцев, к возрасту 24 месяца их количество у крыс OXYS и Вистар снижалось ( $p = 0.05$ ).



**Рис. 6.** Изменения доли митохондриальных филаментов в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS с возрастом. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим возрастом, & -  $p < 0,05$  по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии.

## 2. Нарушение митохондриальной динамики в нейронах гиппокампа крыс OXYS

События митохондриальной динамики при исследовании клеток с помощью электронной микроскопии наблюдаются как две митохондрии, непосредственно контактирующие друг с другом (рис. 7 Б). Таким образом, частота встречаемости этих контактов (рис. 7 А) отражает интенсивность процессов митохондриальной динамики в клетке. В возрасте 20 дней межлинейные различия по этому показателю в нейронах гиппокампа отсутствовали, в возрасте 5 месяцев количество митохондриальных контактов у крыс OXYS было меньше, чем у крыс Вистар ( $p = 0.0017$ ). К возрасту 24 месяцев различия становились двукратными на фоне некоторого увеличения этого параметра у крыс Вистар ( $7.8 \pm 1.6$  и  $14.2 \pm 2.1$  соответственно,  $p = 0.0014$ ).

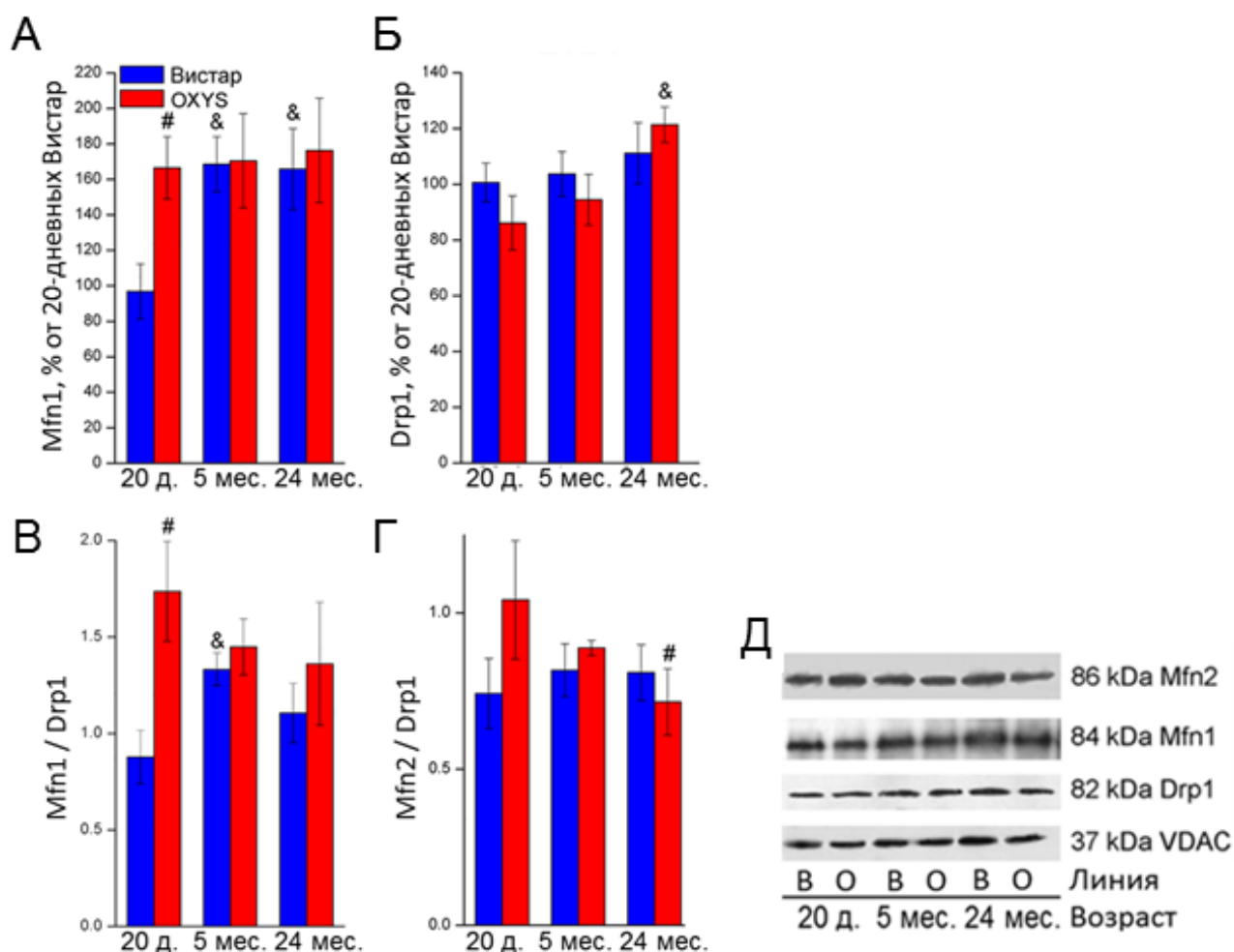


**Рис. 7.** Изменения с возрастом доли митохондрий, участвующих в межмитохондриальных контактах в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS (А). Репрезентативные фотографии митохондрий, участвующих в процессах митохондриальной динамики (Б). Данные представлены как процентное отношение количества митохондрий, участвующих в образовании контактов, к общему количеству митохондрий нейрона. # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар. Бар – 500 нм. Белая стрелка – липофусцин.



На следующем этапе мы оценили в гиппокампе изменения с возрастом уровня белков, непосредственно участвующих в слиянии и делении митохондрий - MFN1, MFN2 и DRP1 (рис. 8 Д). Как показал анализ данных вестерн блот анализа, у 20-ти дневных крыс OXYS уровень MFN1 в гиппокампе был выше чем у крыс Вистар ( $p = 0.01$ ; рис. 8 А), что в комплексе с выявленным у 20-ти дневных крыс OXYS увеличением средней площади среза митохондрий может отражать активизацию их слияния. На повышение активности этого процесса в нейронах гиппокампа указывает также и увеличение отражающего баланс между слиянием и делением митохондрий соотношения уровней белков MFN1/DRP1 у 20-ти дневных крыс OXYS по сравнению с одновозрастными крысами Вистар ( $F_{1,34} = 6.6$ ,  $p = 0.015$ ).

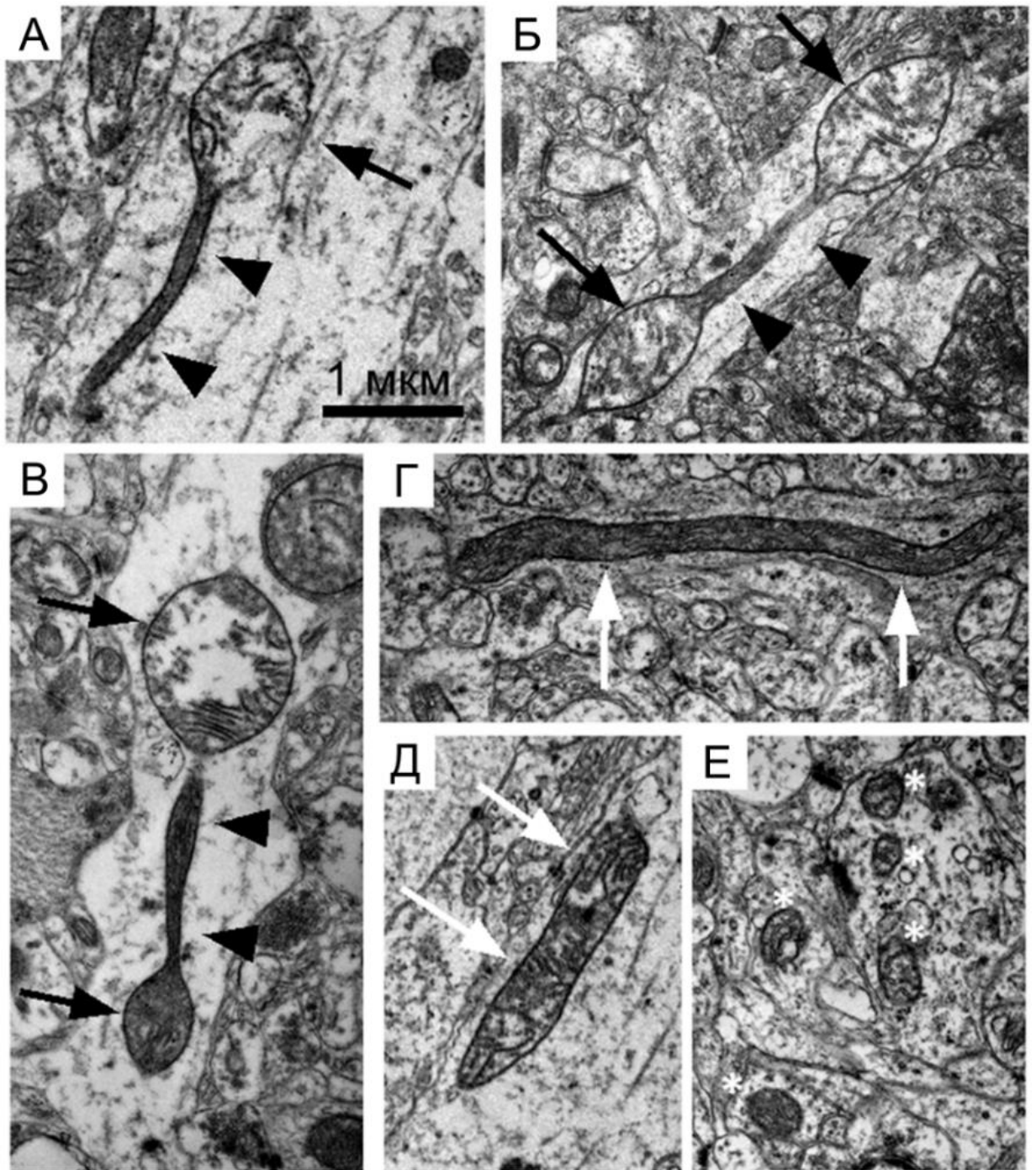
С возрастом уровень MFN1 повышался только у крыс Вистар ( $p < 0.03$ ), также как и соотношение MFN1/DRP1 ( $p < 0.02$ ). У крыс OXYS, напротив, повышалось содержание DRP1 ( $p < 0.05$ ; рис. 8 Б). В то время, как уровень MFN2 не изменялся с возрастом у крыс обеих линий, соотношение MFN2/DRP1 снижалось у крыс OXYS ( $p < 0.05$ ; рис. 8 Г), что отражает увеличение активности деления митохондрий.



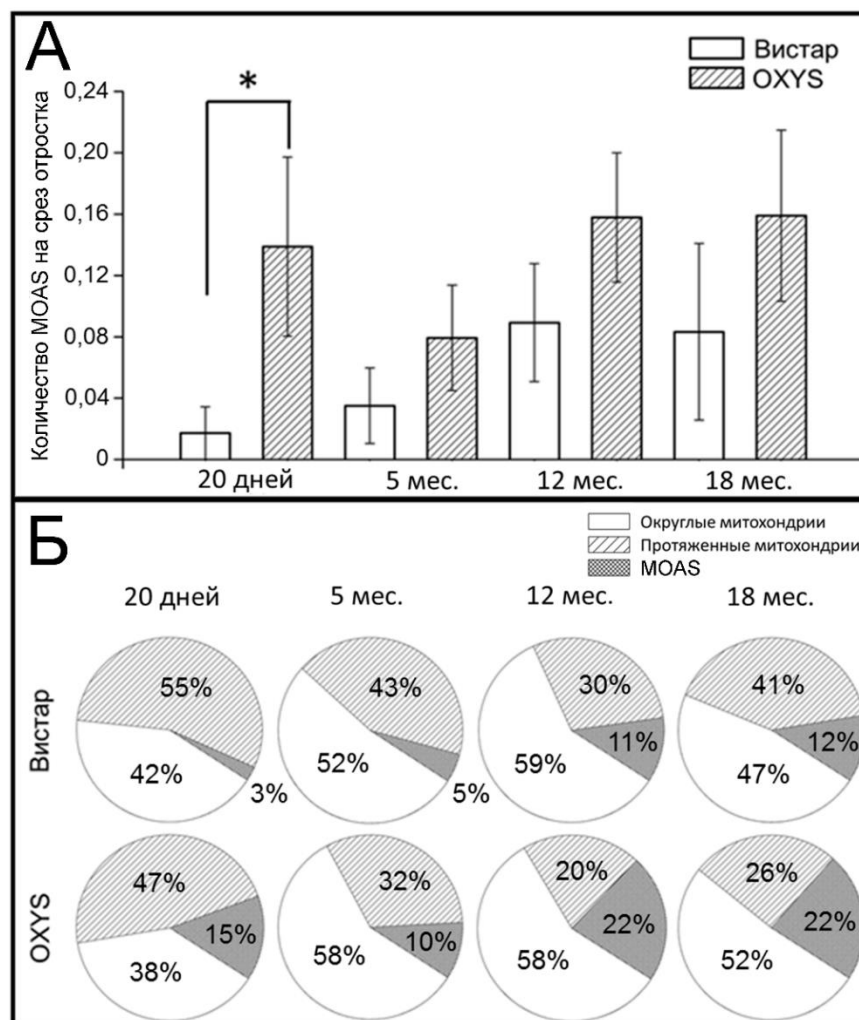
**Рис. 8.** Изменения с возрастом уровня Mfn1 (А) и Drp1 (Б) в гиппокампе крыс OXYS и Вистар. Данные Вестерн-блот анализа,  $n=9$  в группе. Различия достоверны: # - межлинейные различия; & - по сравнению с 20-дневными крысами одной линии.

Как потенциальный признак нарушения процессов митохондриальной динамики мы рассматриваем увеличение в отростках нейронов коры мозга крыс OXYS количества митохондрий с необычным фенотипом - “митохондрий на нитке” (“mitochondria-on-a-string”, MOAS, рис. 9), который недавно Zhang и соавт. (2016) обнаружили в нейронах мозга пациентов с БА и мышей - моделей БА и связали с незавершенным делением. Удельное количество MOAS в нейропиле с возрастом не менялось и было повышено у крыс OXYS ( $F_{1,407} = 6,51$ ,  $p < 0,02$ ), наиболее существенно, в 8 раз, в 20 дней ( $p < 0,02$ ). При этом доля содержащих MOAS отростков нейронов у крыс Вистар

с возраста 20 дней до 18 мес. выросла с 1,7 до 8,3%, а у OXYS - несущественно, поскольку уже в 20 дней достигала 13,9%, а в 18 мес. составила 16% и была вдвое больше, чем у крыс Вистар. Наблюдаемый нами рост количества MOAS в отростках нейронов крыс OXYS может быть связан с нарушением деления протяженных митохондрий на округлые органеллы, что потенциально способно затруднить их аксональный транспорт. У крыс Вистар количество протяженных митохондрий, рассчитанное на один отросток (рис. 10 А), с возрастом не менялось, а у крыс OXYS – снижалось и было в возрасте 5 мес. в 1,8 раз ( $p < 0,036$ ), а в 12 и 18 мес. – в 3 и 2,4 раза меньше, чем в 20 дней ( $p < 0,005$  и  $p < 0,011$ , соответственно). При этом доля протяженных митохондрий – их процент от общего количества митохондрий нейропилия – у крыс OXYS с возраста 20 дней к 12 мес. снижалась вдвое ( $p < 0.002$ ), а доля округлых митохондрий не менялась, как и суммарное количество митохондрий всех морфологических классов (рис. 10 Б).



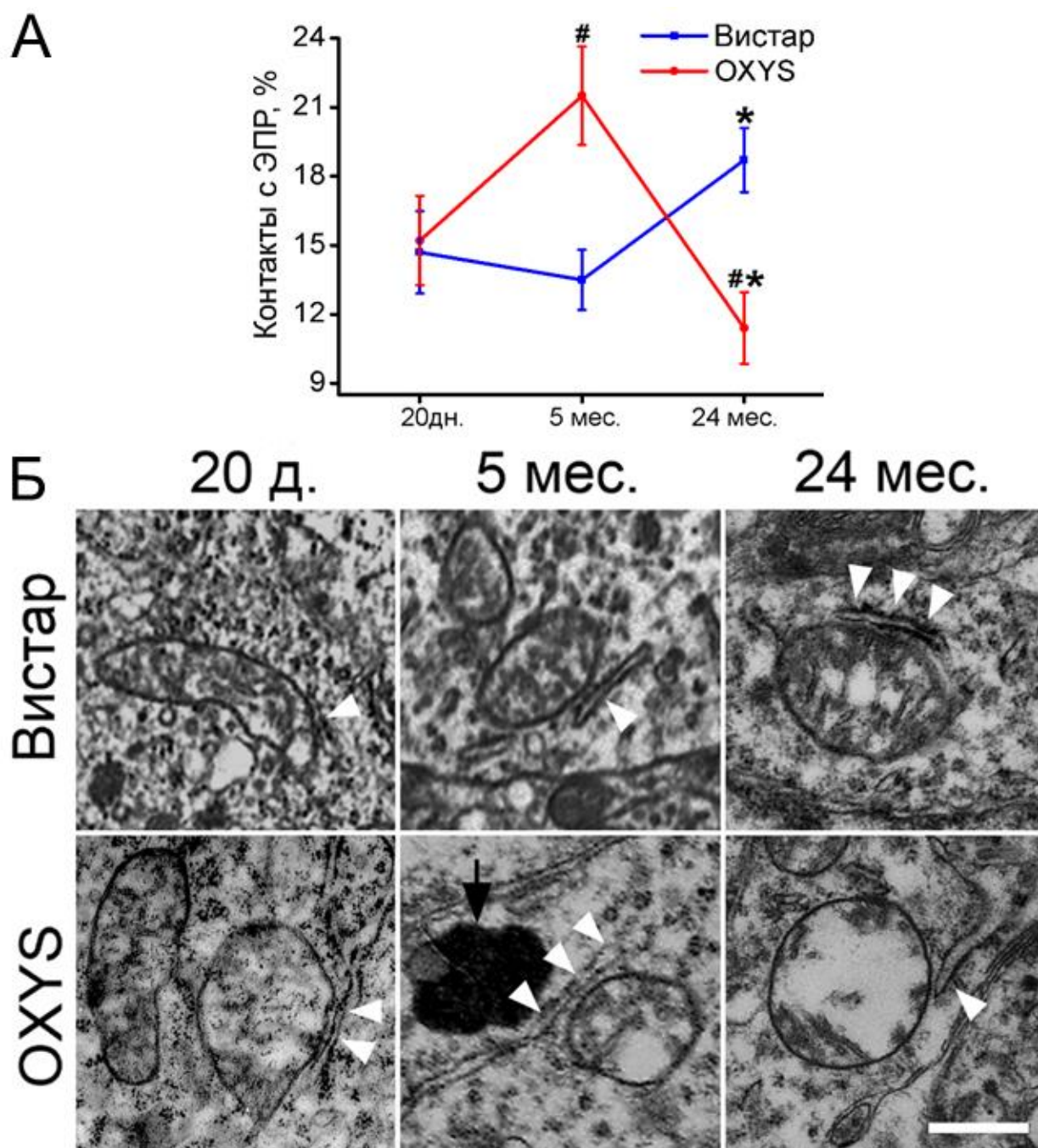
**Рис. 9.** MOAS в отростках нейронов коры крыс OXYS (А-В) представлены округлыми сегментами (черные стрелки), соединенными тонкими участками длиной порядка 1 мкм (короткие черные стрелки). Протяженные митохондрии (белые стрелки), встречающихся в отростках крыс Вистар (Г) и OXYS (Д). Отдельные округлые митохондрии (белые звездочки) составляют большинство митохондрий нейропиля мозга (Е). Бар 1 мкм.



**Рис. 10.** Частота встречаемости «митохондрий-на-нитке» (MOAS) в отростках нейронов мозга крыс Вистар и OXYS. Дисперсионный анализ выявил повышенное содержание MOAS ( $F_{1, 407} = 6,51, p < 0,02$ ) в отростках нейронов коры мозга крыс OXYS (А). Данные представлены как среднее  $\pm$  S.E.M. Увеличение доли MOAS от общего количества митохондрий отростков нейронов коры мозга крыс OXYS происходит на фоне снижения доли протяженных митохондрий (Б).

Образование мембранных контактов митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР) является основным механизмом молекулярного взаимодействия между митохондриями и остальными системами клетки (Rowland, Voeltz, 2012). В возрасте 5 месяцев количество контактов митохондрий с ЭПР (рис. 11 А) у крыс OXYS было в 1,5 раза больше, чем у одновозрастных Вистар ( $p = 0.0017$ ). В то же время с возрастом у крыс OXYS этот параметр снизился вдвое ( $p = 0.0004$ ) и в возрасте 24 месяца

он был ниже по сравнению с одновозрастными Вистар ( $p = 0.0008$ ). У крыс Вистар, напротив, этот параметр увеличивался только к возрасту 24 месяца ( $p = 0.008$ ) и приблизился к значению, зарегистрированному у 5-ти месячных крыс OXYS.

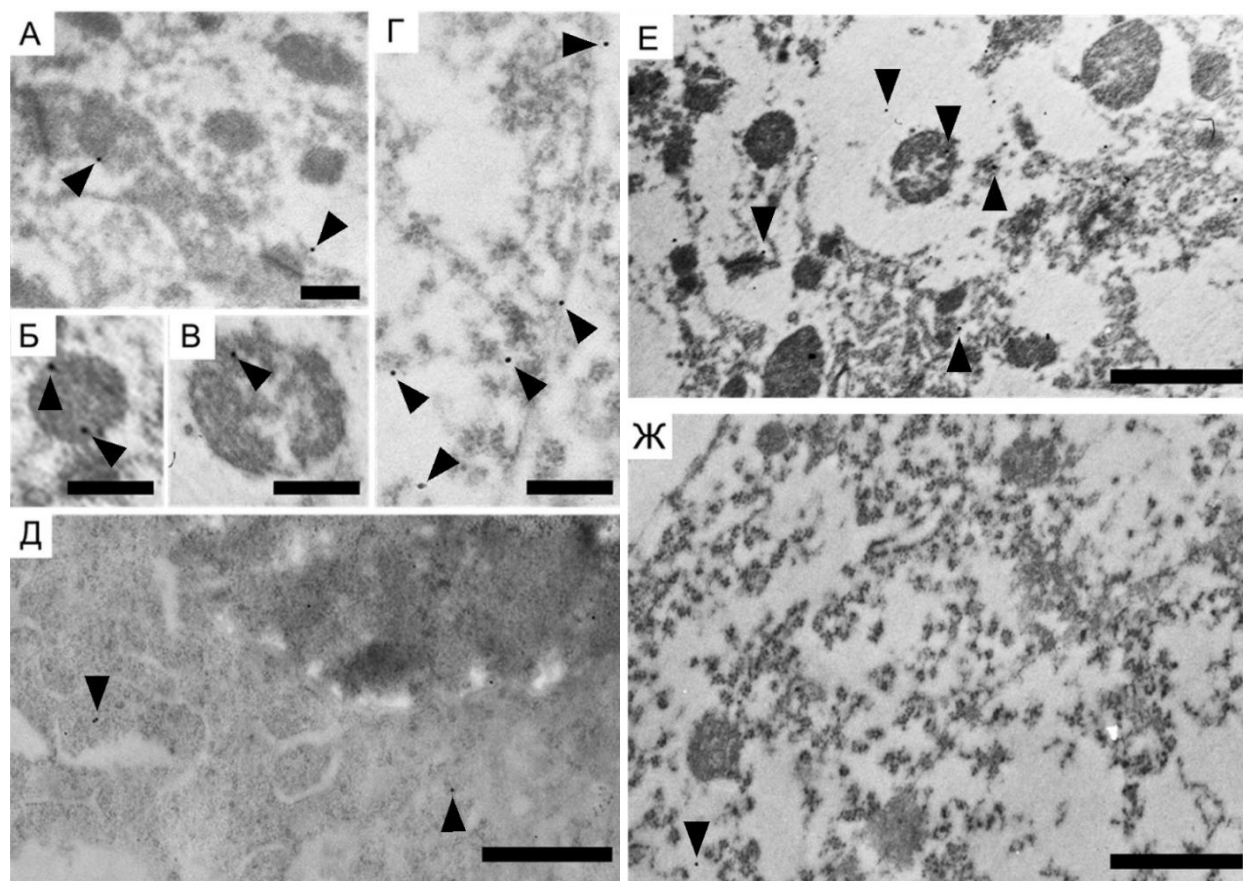


**Рис. 11.** Изменения с возрастом доли митохондрий, контактирующих с ЭПР, в нейронах поля СА1 гиппокампа крыс Вистар и OXYS (А). Репрезентативные фотографии митохондрий, участвующих в процессах митохондриальной динамики (Б). Данные представлены как процентное отношение количества

митохондрий, участвующих в образовании контактов, к общему количеству митохондрий нейрона. # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар, \* -  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим возрастом. Бар 500 нм.

### **3. Локализация мономерных форм пептида бета-амилоида в мозге крыс OXYS**

Токсичность  $A\beta$  для митохондрий показана как в экспериментах с выделенными митохондриями, так и на моделях БА – трансгенных животных и культурах клеток. Проникая в митохондрии,  $A\beta$  способен подавлять окислительное фосфорилирование, усиливать генерацию АФК, снижать трансмембранный потенциал и изменять динамику митохондрий. Но только недавно в работе Schaefer и соавт. (Schaefer et al., 2016) на клеточных линиях было убедительно доказано, что именно  $A\beta$ , а не APP является основным токсическим продуктом, подавляющим работу дыхательной цепи митохондрий. Авторы этой работы предположили, что для реализации токсических эффектов важна внутриклеточная локализация  $A\beta$  – непосредственно митохондриальная. Задачей настоящего раздела работы явилось исследование локализации  $A\beta$  в нейронах поля CA1 гиппокампа крыс OXYS в период активной прогрессии признаков БА (10 мес.) методом иммуногистохимии с помощью антител, меченных наночастицами золота. Анализ ультраструктурных изображений показал, что  $A\beta$  присутствует как в мембранах митохондрий и их матриксе, так и в цитоплазме и ядре нейронов, а также их отростках (рис. 12).



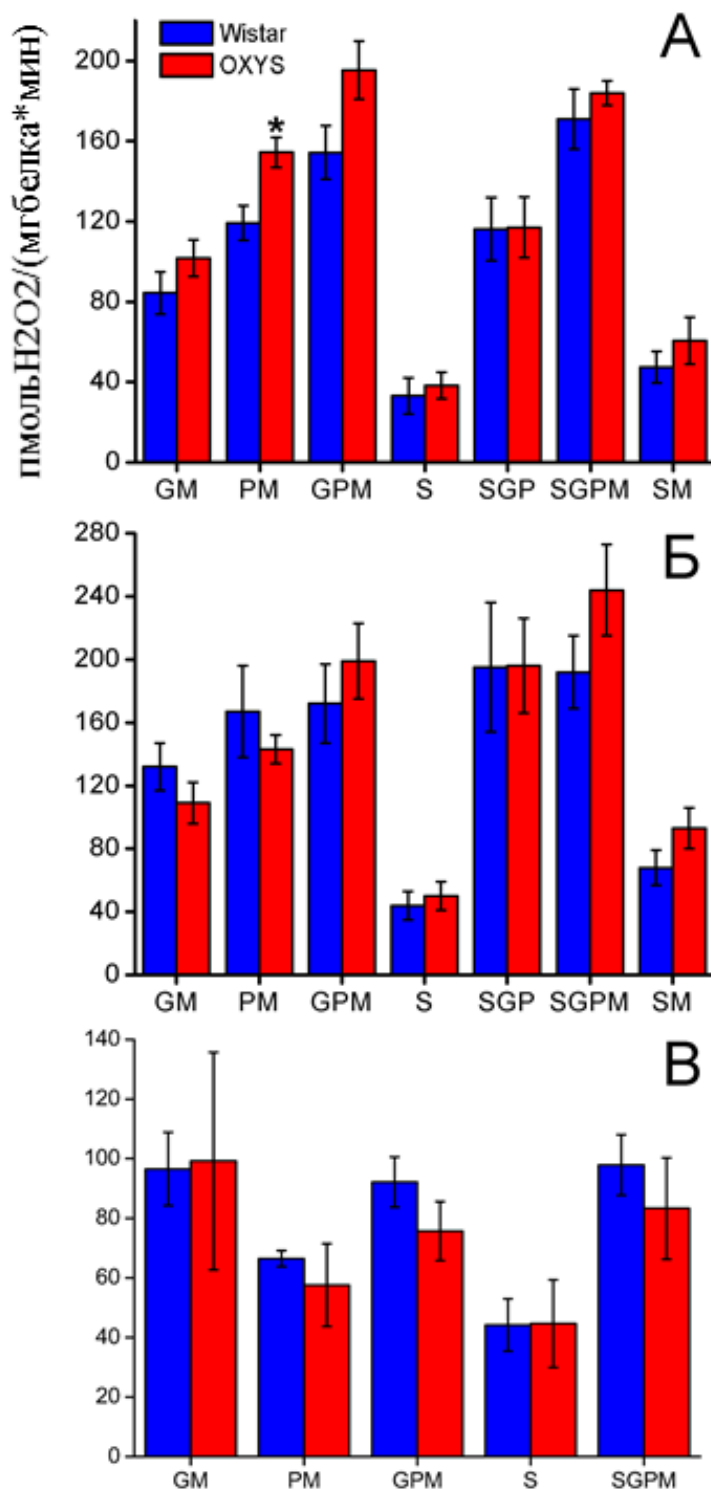
**Рис. 12.** Растворимые формы Аβета (черные стрелки) определяются в митохондриях (А-В), ядре (Г), цитоплазме нейронов (Д) и нейропиле (Е) крыс OXYS в возрасте 10 месяцев. На контрольных препаратах определяются единичные наночастицы (Ж). бары 300 нм (А-В), 1 мкм (Г-Ж).

#### **4. Генерация активных форм кислорода (АФК) митохондриями мозга крыс Вистар и OXYS разного возраста**

Исследовали генерацию АФК выделенными митохондриями мозга крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней, 3 месяца и 24 месяца при окислении ими различных субстратов: пирувата, глутамата, сукцината, малата. В возрасте 20 дней (рис. 13 А) скорость образования АФК митохондриями мозга крыс OXYS при окислении комбинации субстратов пируват+малат была достоверно выше, чем у крыс Вистар. Малат не является полноценным субстратом окисления, но необходим для замыкания цикла Кребса. Пируват является NADH-зависимым субстратом, то есть электроны, высвобождаемые при окислении пирувата, поступают на комплекс 1 цепи переноса электронов. Это позволяет заключить,



что непосредственно на этом комплексе митохондрий крыс OXYS усилено образование АФК.



**Рис. 13.** Скорость образования АФК митохондриями головного мозга крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней (А), 3 месяца (Б) и 24 месяца (В). Данные представлены как количество  $H_2O_2$  (пмоль), генерируемое количеством митохондрий, соответствующих 1 мг белка, за одну минуту. \* -  $p < 0,05$  по

сравнению с крысами Вистар. G – глутамат, P – пируват, S – сукцинат, M – малат.

В возрасте 3 месяцев, когда у крыс OXYS начинают проявляться фенотипические признаки болезни Альцгеймера, и в возрасте 24 месяцев, когда признаки заболевания ярко выражены, значимые различия скорости образования АФК изолированными митохондриями мозга крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар выявлены не были (рис. 13 Б, В).

### **5. Изменение экспрессии UCP2 в коре и гиппокампе крыс OXYS с возрастом**

Появились данные, указывающие на связь патогенеза болезни Альцгеймера со снижением экспрессии белков-разобщителей UCP2 и UCP4, которое наряду с усилением генерации АФК вызывает нарушение механизмов поддержания оптимальной концентрации кальция в митохондриях нейронов (Wu et. al., 2010). На следующем этапе мы исследовали в гиппокампе и коре мозга крыс OXYS и Вистар разного возраста содержание белкового продукта гена митохондриального белка-разобщителя UCP2 - регулятора генерации АФК-.

Содержание белка UCP2 (таблица 1) с возрастом изменялось как в коре мозга ( $F_{2,30}=59$ ,  $p<0.001$ ), так и в гиппокампе ( $F_{2,25}=61$ ,  $p<0.001$ ) крыс обеих линий. С возраста 20 дней к возрасту 3 месяцев он возрастал у крыс Вистар и OXYS в 3 раза в коре ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ , соответственно) и гиппокампе ( $p<0.001$ ,  $p<0.03$ ). В гиппокампе крыс обеих линий в возрасте 24 месяца содержание UCP2 было выше, чем в 3 месяца ( $p<0.001$ ), в то время как в коре мозга крыс обеих линий с возраста 3 до 24 месяца значимых изменений содержания белка UCP2 не произошло. При этом его содержание было несколько ниже, чем у крыс Вистар (на уровне тенденции) в коре 3-месячных ( $p=0.065$ ) и гиппокампе 24-месячных ( $p=0.058$ ) крыс OXYS.

Таблица 1. Содержание белка UCP2 в гиппокампе и коре мозга крыс OXYS и Вистар разного возраста. Данные представлены как нгUCP2/мг общего белка

Возраст	Гиппокамп		Кора	
	Вистар	OXYS	Вистар	OXYS
20 дн.	0.91±0.27	1.03±0.49	2.57±0.28	2.55±0.58
3 мес.	2.75±1.1 <sup>#</sup>	2.7±0.4 <sup>#</sup>	9.16±0.57 <sup>#</sup>	7.58±0.51 <sup>#</sup>
24 мес.	6.75±0.6 <sup>#</sup>	4.91±0.45 <sup>#</sup>	8.89±1.03	8.98±0.67

# - достоверные изменения с возрастом ( $p < 0.05$ )

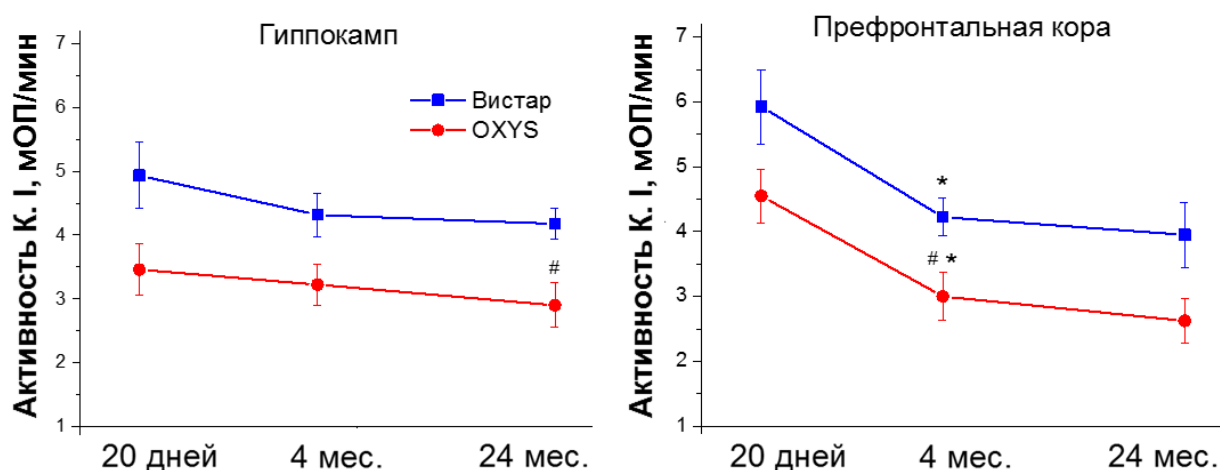
### 6. Изменения активности комплексов дыхательной цепи митохондрий гиппокампа крыс Вистар и OXYS с возрастом

Активность дыхательной позволяет непосредственно оценить эффективность синтеза АТФ митохондриями. На следующем этапе мы оценили изменения с возрастом активности комплексов I, IV и V дыхательной цепи митохондрий гиппокампа крыс Вистар и OXYS, снижение которой рассматривается как один из ключевых признаков развития БА у людей.

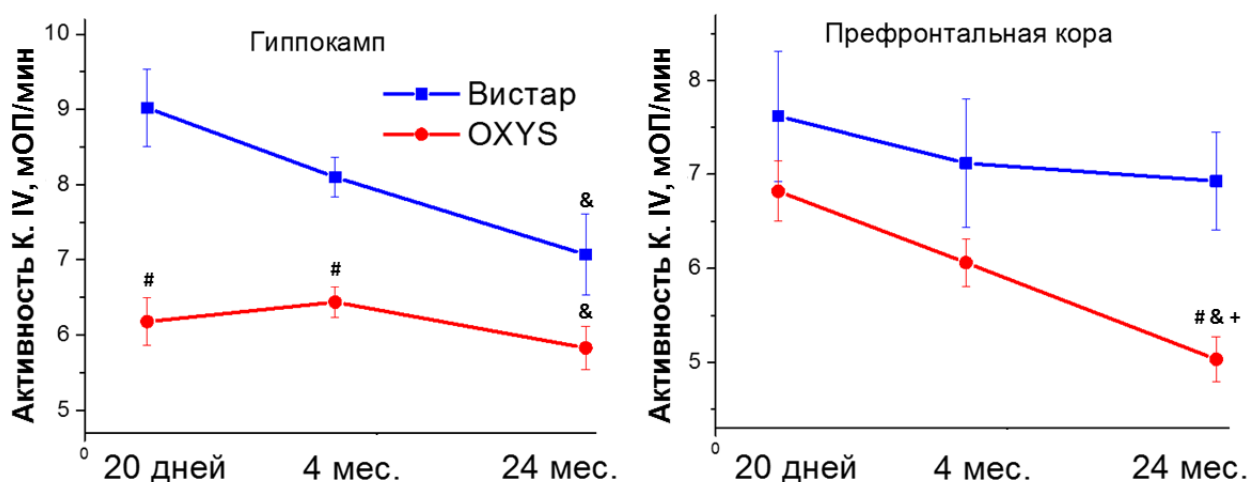
Согласно двухфакторной ANOVA, активность комплекса I (рис. 14) была снижена у крыс OXYS ( $F_{1,23} = 17.4$ ,  $p < 0.0007$ ) и не зависела от возраста ( $F_{2,23} = 1.6$ ,  $p = 0.23$ ). При этом при парных сравнениях только в возрасте 24 месяцев активность комплекса I в гиппокампе крыс OXYS была достоверно ниже чем у одновозрастных крыс Вистар ( $p < 0.03$ ).

Активность комплекса IV (рис. 15) у крыс OXYS также была снижена ( $F_{1,23} = 36.5$ ,  $p < 0.0001$ ) и с возрастом снижалась у крыс обеих линий ( $F_{2,23} = 4.8$ ,  $p < 0.02$ ). Уже в возрасте 20 дней активность комплекса IV в гиппокампе была у крыс OXYS ниже ( $p < 0.002$ ), чем у крыс Вистар и оставалась сниженной в возрасте 4 месяца ( $p < 0.002$ ), демонстрируя также тенденцию к снижению в возрасте 24 месяца ( $p = 0.08$ ). В префронтальной коре с возрастом активность комплекса IV снижалась у крыс обеих линий, но достоверными её изменения были между 20-дневными и 24-месячными животными ( $p < 0.05$ ).

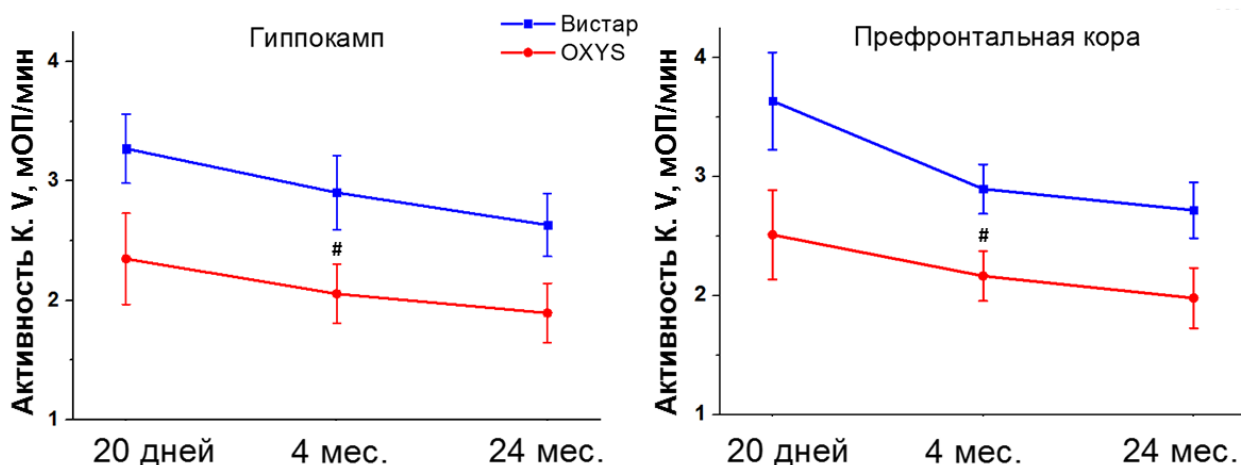
Согласно двухфакторной ANOVA, активность комплекса V (рис. 16) также была у крыс OXYS ниже, чем у крыс Вистар ( $F_{1,39} = 12.2, p = 0.001$ ), при этом межлинейные различия были значимы в возрасте 4 месяца, когда разница активности достигала 30% ( $p < 0.03$  в гиппокампе и  $p < 0.05$  в коре).



**Рис. 14.** Изменения с возрастом активности комплекса I в мозге крыс Вистар и OXYS. ОП – оптическая плотность; К. I – комплекс дыхательной цепи I. Различия достоверны: # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим возрастом.



**Рис. 15.** Изменения с возрастом активности комплекса IV в мозге крыс Вистар и OXYS. ОП – оптическая плотность; К. IV – комплекс дыхательной цепи IV. Различия достоверны: # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар; & -  $p < 0,05$  по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии; + -  $p < 0,05$  по сравнению между 4- и 24-месячными крысами одной линии.



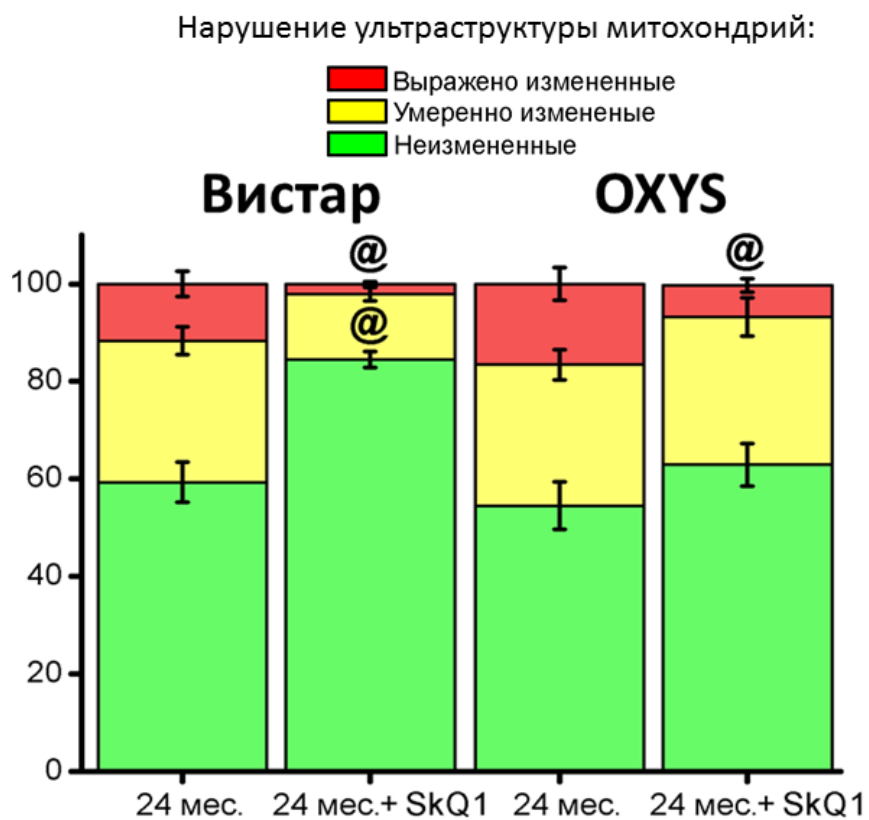
**Рис. 16.** Изменения с возрастом активности комплекса V в мозге крыс Вистар и OXYS. ОП – оптическая плотность; К. V – комплекс дыхательной цепи V. Различия достоверны: # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар;

## 7. Влияние митохондриального антиоксиданта SkQ1 структурно-функциональные параметры митохондрий старых крыс OXYS

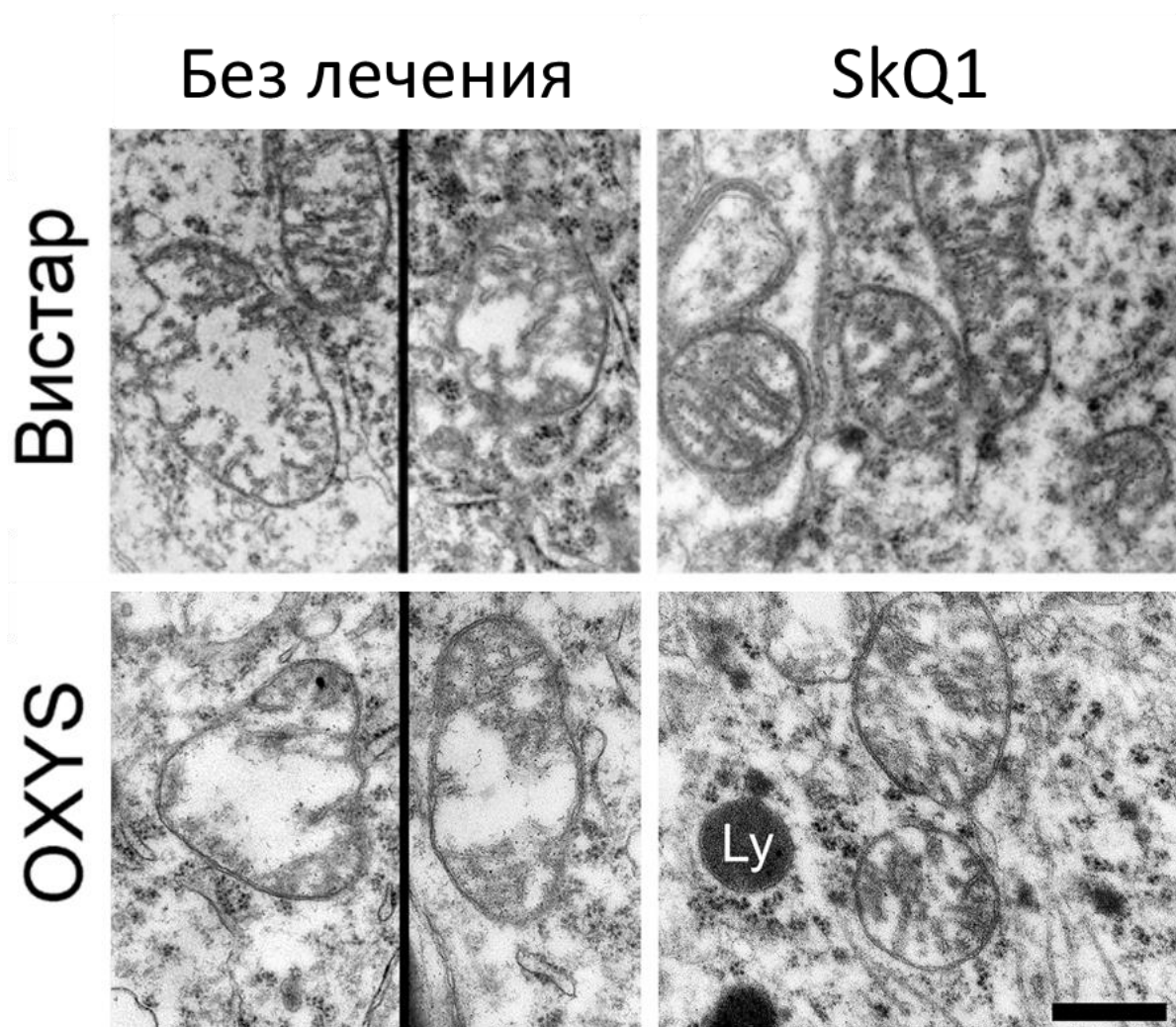
Для оценки связи нейропротекторных эффектов митохондриального антиоксиданта SkQ1 с его влиянием на структурно-функциональные параметры митохондрий крысы OXYS и Вистар с возраста 19 до 24 мес. ежедневно получали по 250 нмоль SkQ1 на кг массы тела животных.

Приём SkQ1 значимо не повлиял на удельное содержание митохондрий в нейронах гиппокампа – оно оставалось у крыс OXYS сниженным по сравнению с крысами Вистар (рис. 19 А). При этом антиоксидант повлиял на структурно-функциональные параметры митохондрий крыс обеих линий, но в разной степени (рис. 17). У крыс Вистар SkQ1 повысил долю неизмененных митохондрий ( $p = 0.00002$ ) за счет снижения доли умеренно и выражено измененных митохондрий ( $p = 0.00003$  и  $p = 0.002$  соответственно). У крыс OXYS SkQ1 снизил содержание значительно измененных митохондрий у крыс ( $p = 0.008$ ). При этом только у крыс OXYS SkQ1 повысил среднюю площадь митохондрий ( $p = 0.009$ ) и не изменил – у крыс Вистар (рис. 19. Б). Также у крыс OXYS прием SkQ1 увеличил долю митохондрий, контактирующих с ЭПР ( $p = 0.03$ ), в результате чего она увеличилась до уровня одновозрастных крыс Вистар (рис. 19. Г), но не повлиял на количество митохондрий (рис. 19.

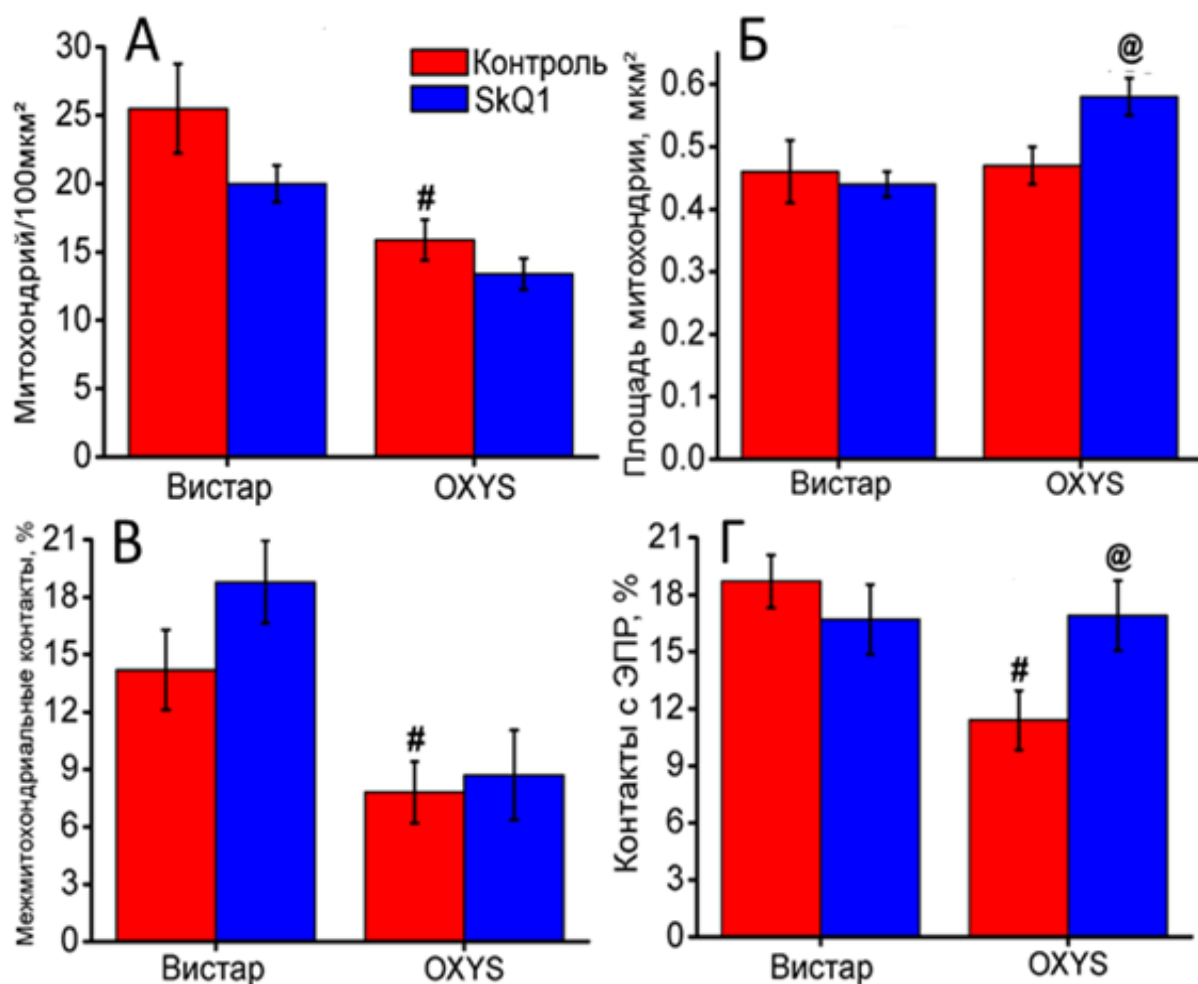
А) и активность митохондриальной динамики, оцениваемое по количеству межмитохондриальных контактов (рис. 19. В).



**Рис. 17.** Влияние антиоксиданта SkQ1 на долю поврежденных митохондрий крыс Вистар и OXYS. @ -  $p < 0,05$  достоверный эффект антиоксиданта SkQ1.

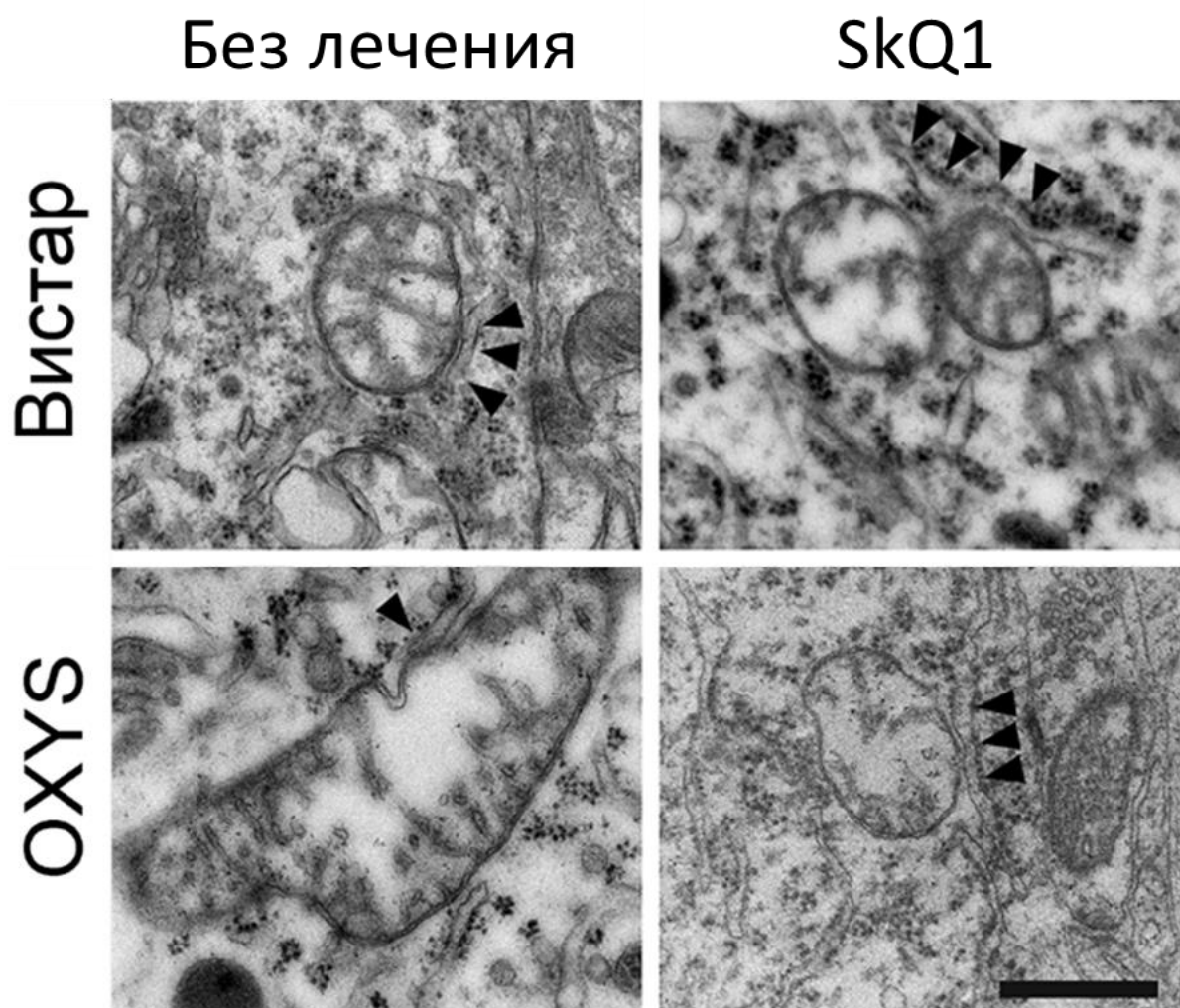


**Рис. 18.** Репрезентативные фотографии ультраструктуры митохондрий в нейронах поля CA1 гиппокампа крыс Вистар и OXYS в возрасте 24 мес. без лечения и при приеме митохондриального антиоксиданта SkQ1. Ly – лизосома. Бар 500 нм.



**Рис. 19.** Влияние антиоксиданта SkQ1 на удельное количество (А) и площадь (Б) митохондрий, долю митохондрий, образующих межмитохондриальные контакты (В) и контакты с ЭПР (Г) у крыс Вистар и OXYS. # -  $p < 0,05$  по сравнению с крысами Вистар, @ -  $p < 0,05$  достоверный эффект антиоксиданта SkQ1.





**Рис. 20** Репрезентативные фотографии митохондрий, контактирующих с ЭПР, в нейронах поля СА1 гиппокампа крыс Вистар и OXYS в возрасте 24 мес. без лечения и при приеме митохондриального антиоксиданта SkQ1 (отмечены черными стрелками). Бар 500 нм.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Старение людей и животных характеризуется постепенным снижением способности к обучению и памяти, повышением риска развития нейродегенеративных заболеваний, в том числе – самого распространенного из них – БА. Как «физиологическое» старение головного мозга, так и развитие БА тесно связаны со структурно-функциональными нарушениями митохондрий, однако масштабы этих нарушений существенно различаются (Grimm, Friedland, Eckert, 2016). Существуют убедительные доказательства того, что митохондриальная дисфункция вносит существенный вклад в развитие и прогрессию БА (Cardoso et al. 2017). Однако причинно-следственная связь между развитием митохондриальной дисфункции и нейродегенеративных изменений, в том числе последовательность этих событий, в патогенезе БА остаётся до конца не ясной. Очевидно, что развитие митохондриальной дисфункции может быть обусловлено снижением активности окислительного фосфорилирования, повышенным образованием АФК, нарушением митохондриальной динамики или коммуникации между органеллами, однако исследование последовательности возникновения подобных нарушений у людей проблематично, особенно на доклинических этапах развития заболевания в связи с трудностью ранней диагностики, долгим временем прогрессии симптомов и затрудненностью инвазивных манипуляций. Этот вопрос мы исследовали на крысах OXYS, у которых с возрастом развиваются все ключевые признаки БА. Недавно было показано, что прогрессия признаков БА у крыс OXYS тесно связана со структурно-функциональными изменениями митохондрий (Stefanova et al., 2015, 2016), в то же время оставался открытым вопрос об их вкладе в инициацию и развитие патологических молекулярных каскадов БА у крыс OXYS.

В настоящем исследовании мы показали, что нарушения структурно-функциональных параметров митохондрий могут предшествовать развитию признаков БА и выступать в качестве фактора риска раннего развития спорадической формы заболевания. Мы показали, что манифестация и

прогрессия признаков БА, развитие нейродегенеративных изменений в мозге крыс OXYS происходят на фоне усугубляющихся структурно-функциональных нарушений митохондрий. В результате развитие дисфункции митохондрий предшествует накоплению токсических форм Абета (Stefanova et al., 2015), которое, однако, в дальнейшем может способствовать прогрессии заболевания, усугубляя митохондриальную патологию, запуская финальную, необратимую стадию развития БА (Stefanova et al., 2014).

Одним из подходов к исследованию патогенеза заболеваний является анализ механизмов действия факторов, способных влиять на их развитие. Ранее нашими коллегами была показана способность адресованного в митохондрии антиоксиданта SkQ1 замедлять развитие ряда ассоциированных со старением заболеваний, снижая выраженность деструктивных изменений митохондрий, в том числе – в мозге (Бакеева и др., 2008; Нероев и др., 2008; Vays et al., 2014). Также на модели преждевременного старения – мышцах, мутантных по гену митохондриальной ДНК-полимеразы POLG, показано, что прием SkQ1 начиная с возраста 100 дней способен замедлять развитие таких возрастных изменений, как потеря веса, нарушения работы сердца, печени и почек, кифоз, потеря шерсти, а также увеличивать продолжительность жизни животных на 15% (Shabalina et al., 2017). В настоящем исследовании мы изучали способность SkQ1 влиять на структурно-функциональные параметры митохондрий нейронов гиппокампа - отдела мозга, который поражается при БА одним из первых – у старых животных с выраженными нейродегенеративными изменениями.

### **Анализ связи развития признаков БА у крыс OXYS с дисфункцией митохондрий**

Мы показали, что уже на доклинической стадии развития признаков БА, в возрасте 20 дней, крысы OXYS демонстрируют ряд структурных и функциональных изменений митохондрий, которые в дальнейшем нарастают

в возрасте манифестации признаков БА (возраст 3 – 5 месяцев) и их прогрессии (возраст 24 месяца). Так, уже с возраста 20 дней у крыс OXYS наблюдается снижение активности комплекса IV дыхательной цепи в митохондриях гиппокампа. Такое снижение оказывается характерным для митохондрий гиппокампа крыс OXYS на всех этапах развития признаков БА, а также обнаруживается у них в митохондриях префронтальной коры в возрасте 24 месяцев. Важно отметить, что снижение активности этого комплекса является типичным признаком, развивающимся в ходе старения и развития возраст-ассоциированных заболеваний во многих органах (Payne, Chinnery, 2015). В дополнение к нарушению работы комплекса IV у крыс OXYS наблюдается тенденция к снижению активности комплексов I и V.

Также в возрасте 20 дней на фоне снижения активности дыхательной цепи митохондрии гиппокампа крыс OXYS демонстрируют смещение митохондриальной динамики в направлении слияния, о чем свидетельствует повышенное по сравнению с одновозрастными Вистар содержание отвечающего за слияние митохондрий белка MFN1 в гиппокампе. Показано, что усиленное слияние митохондрий приводит к формированию обширной митохондриальной сети, образованной вытянутыми, разветвленными митохондриями. Считается, что подобный митохондриальный фенотип способствует усиленному синтезу АТФ (Chen et al., 2009) благодаря высокой емкости в такой сети трансмембранного протонного потенциала, необходимого для работы АТФ-синтаз, а также способности поддерживать и эффективно регулировать уровень кальция, одним из основных депо которого в клетке являются митохондрии. Такие результаты согласуются с полученными нашими коллегами данными о повышенных соотношениях креатин-фосфата к неорганическому фосфату [PCr/Pi] и креатин-фосфата к АТФ в мозге крыс OXYS в возрасте 2-3 недель (по сравнению с Вистар), которое указывает на повышение активности энергетического метаболизма и может представлять собой адаптивную реакцию к состоянию гипоксии (Sergeeva et al., 2006, Stefanova et al., 2014).

К возрасту 20 дней у крыс завершается постнатальный период развития мозга, в ходе которого в ряде отделов мозга, включая гиппокамп, продолжается нейрогенез и происходит клеточная гибель популяций нейронов, отростки которых не образовали контакты с другими клетками (Paolicelli et al., 2011). Показано, что апоптотическая активность (Kim, Sun, 2011), а также нейрогенез (Walton, 2012) приводят к повышенному синтезу АФК. Принципиально важно, усиленную по сравнению с крысами Вистар генерацию АФК в митохондриях мозга у крыс OXYS нам удалось выявить только в возрасте 20 дней и при окислении одного набора субстратов – пирувата+малата, что может указывать на то, что комплекс I является основным местом генерации АФК при окислении NADH-зависимого субстрата пирувата (малат не является полноценным субстратом окисления, но способствует протеканию реакций в ЦТК выделенных митохондрии).

Такие результаты в целом согласуются с полученными нашими коллегами данными о том, что в период постнатального развития мозга в гиппокампе крыс OXYS значительно повышено количество протяженной делеции митохондриальной ДНК (4834 пар нуклеотидов), накопление которой рассматривается как маркер окислительных повреждений (Loshchenova et al., 2015), потенциально способных приводить к развитию митохондриальной дисфункции. В возрасте 10-14 дней накопление этой делеции в митохондриальной ДНК в гиппокампе крыс OXYS было значительно выше, чем у крыс Вистар. При этом принципиально важно, что как у крыс OXYS, так и у крыс Вистар накопление делеции в этом возрасте было выше, чем в 24 месяца, а к возрасту 3-6 месяцев снижалось.

Таким образом, повышенное образование АФК митохондриями мозга у крыс OXYS имеет место только на доклинической стадии, задолго до начала накопления амилоидных бляшек, гиперфосфорилирования тау-белка и развития поведенческих нарушений. Кроме того, ранее было показано, что когнитивные нарушения у крыс OXYS проявляются до того, как в мозге обнаруживается значительное накопление маркеров окислительного стресса

(Kolossova et al., 2006). Это согласуется с недавними исследованиями, указывающими на то, что окислительные повреждения макромолекул – липидов, белков и ДНК - в мозге пациентов с БА могут быть, по крайней мере частично, связаны с воспалительными процессами, а не только и не столько с усиленной генерацией АФК митохондриями (Desler et al., 2017).

В течение долгого времени повышенное образование АФК рассматривалось как основной движущий фактор развития как митохондриальной патологии, так и многих возраст-ассоциированных заболеваний, в которых развитие митохондриальной дисфункции играет важную роль. В силу методических особенностей исследования генерации АФК митохондриями мозга мы не можем дать строгую оценку её изменений с возрастом. В то же время можем утверждать, что у крыс OXYS в возрасте, когда признаки БА начинают проявляться, и в возрасте, когда они ярко выражены (5 мес. и 24 мес. соответственно) мы не обнаружили повышенного образования АФК, несмотря на накопление к возрасту 24 месяцев значительно поврежденных митохондрий в пирамидных нейронах гиппокампа. Такие результаты согласуются с полученными нашими коллегами ранее данными о том, что образование АФК выделенными митохондриями печени крыс OXYS в возрасте 4 и 12 месяцев снижено на фоне некоторого снижения трансмембранного потенциала (Men'shchikova et al, 2002).

Мы предположили, что митохондрии крыс OXYS могут находиться в состоянии «мягкого разобщения» – умеренного снижения трансмембранного потенциала, благодаря которому достигается значительное снижение образования АФК (Brand, 2000). Считается, что основную роль в таком снижении трансмембранного потенциала играют белки-разобщители, в частности, экспрессирующийся во многих тканях белок UCP2. Это белок разобщает окисление и фосфорилирование, являясь альтернативным АТФ-синтазе каналом возвращения протонов в митохондриальный матрикс, что ускоряет транспорт электронов в дыхательной цепи к конечному акцептору и поддерживает их в более окисленном состоянии (Korshunov et al., 1997). Наши

эксперименты показали, что у крыс OXYS, как и у крыс Вистар, с возрастом происходит значительное увеличение содержания белка UCP2 как в гиппокампе, так и в префронтальной коре. С другой стороны, у крыс OXYS в гиппокампе это увеличение было менее выражено в возрасте, начиная с которого у крыс OXYS обнаружено значительное снижение количества митохондрий в пирамидных нейронах гиппокампа: снижение было 1,5-кратным в возрасте манифестации признаков БА и 2-кратным в возрасте ярко выраженных изменений. Поскольку мы оценивали содержание UCP2 не в выделенных митохондриях, а в ткани гиппокампа и коры, точная оценка межлинейных различий его количества, локализованного непосредственно на внутренней мембране митохондрий при таком подходе затруднена. Вместе с тем можно предположить, что, ввиду уменьшения общего снижения биомассы митохондрий и при отсутствии межлинейных различий уровня UCP2, содержание этого белка на одну митохондрию у крыс OXYS может быть выше. Наши результаты согласуются с работой Lores-Arnaiz и соавт. (Lores-Arnaiz et al., 2016), в которой показано, что количество белка UCP2 как в митохондриях синапсом, так и в несинапсомальных митохондриях, у 17-месячных мышей повышено по сравнению с молодыми животными. Увеличение экспрессии UCP2 может являться механизмом, за счет которого обеспечивается устойчивость к оксидативному стрессу в ходе старения. В соответствии с гипотезой «разобщения ради старения» (Brand, 2000), подобная тенденция к активизации разобщения может являться универсальным адаптивным механизмом клеток стареющего организма.

Данные об изменении количества митохондрий в ходе старения мозга ограничены, но в целом отмечается тенденция к увеличению этого показателя с возрастом (Swerdlow, 2011). У крыс Вистар в возрасте 24 месяцев мы наблюдали тенденцию к увеличению количества митохондрий в нейронах гиппокампа. В то же время у крыс OXYS в возрасте 5 месяцев наблюдалось снижение количества митохондрий, которое оставалось сниженным и в возрасте 24 месяцев, таким образом, оказываясь в этом возрасте значительно

меньшим по сравнению с крысами Вистар. Начиная с возраста 4 месяцев к возрасту 24 месяца у крыс OXYS мы наблюдали смещение митохондриальной динамики в направлении деления, о чем свидетельствует увеличение в гиппокампе содержания основного белка митохондриального деления DRP1. Снижение активности слияния митохондрий и образование множества мелких митохондрий характерно для ряда митохондриальных заболеваний. (Knott et al., 2008). Известно, что усиленное деление митохондрий само по себе может способствовать снижению количества митохондрий за счет того, что мелкие митохондрии в меньшей степени способны поддерживать нормальные значения трансмембранного потенциала и в большей степени подвержены аутофагии (Eckert, Shmitt, Gotz, 2011).

Как показали наши исследования, уже в возрасте 20 дней в нейропиле коры мозга крыс OXYS значительно повышено содержание митохондрий с необычной морфологией, выявленных недавно у пациентов с БА (Zhang et al., 2016) - «митохондрий-на-нитке» (“mitochondria-on-a-string”, MOAS). Менее существенно их количество повышено у крыс OXYS как в период манифестации признаков БА, так и при прогрессии заболевания. Впервые описавшие феномен образования MOAS авторы (Zhang et al., 2016, Morozov et al., 2017) связывают их появление не со смещением баланса между делением и слиянием митохондрий, а с нарушением работы белкового комплекса, отвечающего за образование мембранной перетяжки и ее разрезание в ходе деления митохондрий, ключевую роль в котором играет белок DRP1. В то же время по их данным MOAS формируются на фоне неизмененного содержания белка DRP1 – классического маркера состояния митохондриальной динамики (Zhang et al., 2016). Как отмечалось выше, нарушение баланса процессов слияния и деления митохондрий в нейронах гиппокампа у крыс OXYS происходит на фоне изменения соотношения белков-маркеров слияния и деления MFN1/DRP1 за счет увеличения с возрастом уровня белка DRP1. При этом в возрасте 20 дней при отсутствии признаков БА в нейронах гиппокампа крыс OXYS повышены как содержание белка MFN1, так и соотношение



MFN1/DRP1 и, соответственно, образование крупных митохондрий. Считается, что повышение содержания таких высоко связанных митохондрий направлено на усиление энергоснабжения в условиях снижения активности дыхательной цепи (Westermann, B., 2012), которое мы наблюдаем у 20-дневных крыс OXYS (Tyumentsev et al., 2018), и может рассматриваться как компенсаторная реакция. Как показали результаты настоящей работы, уже в возрасте 20 дней у крыс OXYS усилено образование MOAS, которое, в соответствии с концепцией Zhang и соавторов (Zhang et al., 2016), также может рассматриваться как адаптивный ответ на биоэнергетический стресс. В то же время можно предположить, что длительное повышение количества MOAS способно негативно влиять на аксональный транспорт – нарушать трафик органелл вдоль элементов цитоскелета, создавая “заторы” в нейрональных отростках, препятствуя дальнейшему везикулярному транспорту и транспорту митохондрий (Correia, Perry, Moreira, 2016). В результате аномальный митохондриальный транспорт приводит к синаптическому голоданию и неэффективной элиминации поврежденных митохондрий, нарушает работу синапсов и вызывает дегенерацию нейронов при БА (Correia, Perry, Moreira, 2016).

Таким образом, MOAS, недавно выявленные в отростках нейронов коры пациентов с БА и моделирующих раннюю форму заболевания трансгенных животных, а также у старых макак-резус (Zhang et al., 2016, Morozov et al., 2017), присутствуют в незначительных количествах и у крыс Вистар, и с возрастом доля содержащих MOAS отростков у них увеличивается. Но при этом количество MOAS в отростках нейронов коры мозга значительно повышено у крыс OXYS – модели спорадической формы БА, в том числе – на ранней “доклинической” стадии заболевания. Сегодня мы не можем определить значение этого феномена, однако полученные результаты подтверждают значимость нарушений динамики митохондрий для патогенеза БА, а также связь их развития с появлением MOAS - митохондрий с необычной морфологией характерного фенотипа органелл – “митохондрий на нитке”.

Митохондрии находятся в тесном контакте с ЭПР – как механически, так и биохимически. Формирование и поддержание этих контактов обеспечиваются за счет образования на ЭПР мембран, ассоциированных с митохондриями, основополагающей характеристикой которой являются липидные рафты - обогащенные сигнальными белками участки мембраны с низкой текучестью, которую определяет высокое содержание холестерина. Контакты с ЭПР играют важную роль в процессах митохондриальной динамики, митофагии, транспорта липидов, кальциевой сигнализации (Rowland, Voeltz 2012). Было показано, что умеренное увеличение поступления кальция в митохондрии из ЭПР через мембранные контакты способствует активизации синтеза АТФ (Bravo et al., 2011). Таким образом, выявленное нами повышенное образование контактов митохондрий с ЭПР в нейронах гиппокампа крыс OXYS, приходящееся на возраст 5 месяцев, период манифестации признаков БА, может быть частью компенсаторного ответа, направленного на увеличение снабжения клеток АТФ и усиление контроля качества посредством аутофагии в условиях сниженного количества митохондрий. Повышение образования контактов с ЭПР наблюдается также и у людей с БА как в фибробластах пациентов с наследственной формой БА, так и в образцах мозга, исследованных *post mortem*, а также в модельных линиях мышечных (Hedskog et al., 2013). С другой стороны, процесс митохондриального деления происходит при непосредственном участии тубул ЭПР, обхватывающих митохондрии в месте будущего деления. Таким образом, увеличение частоты контактов митохондрий с ЭПР само по себе может способствовать их фрагментации. Кроме того, начиная с возраста 5 месяцев митохондрии пирамидных нейронов гиппокампа крыс OXYS, по сравнению с крысами Вистар, чаще прилежат к ядру, что может указывать на повышенную потребность ядра в АТФ в период манифестации и прогрессии признаков БА. Также такое расположение митохондрий может свидетельствовать о нарушении их транспорта и повышении активности митофагии (Zhu, Chu, 2010).

Важно отметить, что после наблюдаемого в возрасте 5 месяцев увеличения количества митохондриальных контактов с ЭПР, к возрасту 24 месяцев у крыс OXYS происходит значительное снижение этого параметра на фоне прогрессии признаков БА. Это изменение сопровождается накоплением A $\beta$  и его локализацией в митохондриях, гиперфосфорилированием тау-белка, нарушением синаптических контактов и гибелью нейронов. Таким образом, мы можем предположить, что в возрасте 24 месяцев у крыс OXYS имеют место признаки истощения возможностей наблюдающегося в возрасте 5 месяцев компенсаторного ответа, способствующего поддержанию необходимого уровня АТФ и обеспечению контроля качества митохондрий. Интересно отметить, что у крыс Вистар количество контактов митохондрий с ЭПР возрастает только в позднем возрасте – к 24 месяцам, в определенной степени воспроизводя феномен, наблюдающийся у крыс OXYS в возрасте 5 месяцев. У OXYS к этому возрасту данный показатель уже значительно снижен как по сравнению с предыдущим возрастом, так и по сравнению с одновозрастными крысами Вистар.

К возрасту 24 месяцев в пирамидных нейронах гиппокампа крыс OXYS по сравнению с возрастом 5 месяцев повышается доля умеренно и значительно поврежденных митохондрий. Это также указывает на то, что к этому возрасту механизмы контроля качества, обеспечивающие удаление поврежденных митохондрий, оказываются несостоятельными. Подобным образом количество умеренно поврежденных митохондрий увеличивается также и у крыс Вистар. Следует отдельно подчеркнуть, что несмотря на то, что межлинейные различия в доле поврежденных митохондрий обнаруживаются только к возрасту 24 месяца (в котором у крыс OXYS повышена по сравнению с Вистар доля значительно поврежденных митохондрий), как в возрасте 5 месяцев, так и в возрасте 24 месяцев количество митохондрий в нейронах гиппокампа у крыс OXYS остается значительно сниженным по сравнению с крысами Вистар. В результате при аналогичном процентном содержании неповрежденных митохондрий у крыс OXYS и Вистар, на каждую отдельную

полноценную митохондрию у OXYS приходится повышенной функциональная нагрузка – при том предположении, что в нейронах крыс OXYS не снижается тем или иным образом потребность в синтезе АТФ. В дополнение к этому следует подчеркнуть, что у крыс OXYS всех исследованных возрастных групп в той или иной мере снижена активность комплексов дыхательной цепи.

### **Анализ влияния антиоксиданта SkQ1 на структурно-функциональное состояние митохондрий крыс OXYS**

Один из подходов к исследованию механизмов развития заболеваний – изучение действия факторов, способных влиять на предполагаемые ключевые звенья их патогенеза. В данной работе мы исследовали способность направленного в митохондрии антиоксиданта SkQ1 влиять на развитие признаков БА у 19-месячных крыс OXYS, у которых признаки заболевания существенно выражены. К возрасту начала получения препарата SkQ1 крысы OXYS демонстрируют явно выраженные признаки нейродегенерации на фоне значительного накопления токсических форм амилоида бета, образования амилоидных бляшек, гиперфосфорилирования тау-белка, митохондриальной дисфункции, синаптической недостаточности, а также нарушений способности к обучению и памяти (Stefanova et al., 2014a; Stefanova et al., 2014b; Stefanova et al., 2015).

Как показал анализ ультраструктуры митохондрий, приём антиоксиданта SkQ1 позитивно повлиял на её параметры в нейронах гиппокампа. Прежде всего, он снизил долю значительно поврежденных митохондрий у крыс OXYS, однако не повлиял на общее количество нейрональных митохондрий, которое оставалось сниженным у OXYS по сравнению с одновозрастными крысами Вистар. Кроме того, прием SkQ1 увеличил средний размер митохондрий. В то время, как увеличение среднего размера митохондрий с возрастом может быть связано с увеличением доли поврежденных, раздутых митохондрий, увеличение размера митохондрий, связанное с приемом SkQ1,

сопровождалось у крыс OXYS увеличением доли неповрежденных митохондрий и увеличением частоты образования контактов митохондрий с ЭПР, что может указывать на восстановление коммуникации между органеллами и восстановление процессов митохондриальной динамики.

Старение людей и животных связано с медленным снижением способности к обучению и памяти, изменением поведенческого стереотипа и с увеличением риска нейродегенеративных заболеваний. Формирование пассивного типа поведения, повышенная тревожность, нарушение способности к обучению становятся первыми фенотипическими проявлениями ускоренного старения мозга крыс OXYS и впервые проявляются уже в возрасте 3 месяцев, после чего прогрессируют с возрастом (Kolossova et al., 2012). В рамках комплексного исследования эффектов приема SkQ1 с возраста 19 месяцев в настоящем исследовании мы показали, что антиоксидант значительно повысил двигательную и исследовательскую активность крыс OXYS в возрасте 24 месяца, но при этом только двигательную активность - у крыс Вистар. В результате уровень исследовательской активности у крыс Вистар и крыс OXYS, получавших SkQ1, не различался (Kolossova et al., 2017).

Ранее было показано, что поведенческие и когнитивные нарушения развиваются у крыс OXYS уже к возрасту 3 месяцев на фоне признаков нейродегенерации, одним из которых становится образование очагов демиелинизации, регистрируемых в этом возрасте у 75% животных методами МРТ (Stefanova et al., 2014, Kolossova, 2011). Демиелинизация имеет место как в ходе «здорового» старения мозга, так и при БА, но масштабы изменений при этом значительно различаются (Serrano-Pozo A. et al., 2010). Известно, что общее снижение когнитивных способностей и ухудшение памяти при БА коррелируют с демиелинизацией поверхностного белого вещества, что позволяет использовать МРТ для оценки региональной патологии по отношению к снижению когнитивных способностей при ранних стадиях заболевания (Fornari et al., 2012). Начиная с возраста 9-12 месяцев очаги

демиелинизации регистрируются у всех крыс OXYS, что происходит на фоне снижения у них типичного для пациентов с БА кровоснабжения мозга (измеренного с помощью MPT), тогда как у крыс Вистар подобные изменения наблюдаются только в 30% случаев. В нашем исследовании наличие очагов демиелинизации было выявлено в мозге всех контрольных и получавших SkQ1 крыс OXYS. Только у крыс Wistar прием SkQ1 достоверно снизил долю животных с демиелинизацией с 75 до 40% ( $p < 0,05$ ) и не повлиял на количество очагов демиелинизации, которая была в четыре раза больше у крыс OXYS ( $p < 0.001$ ).

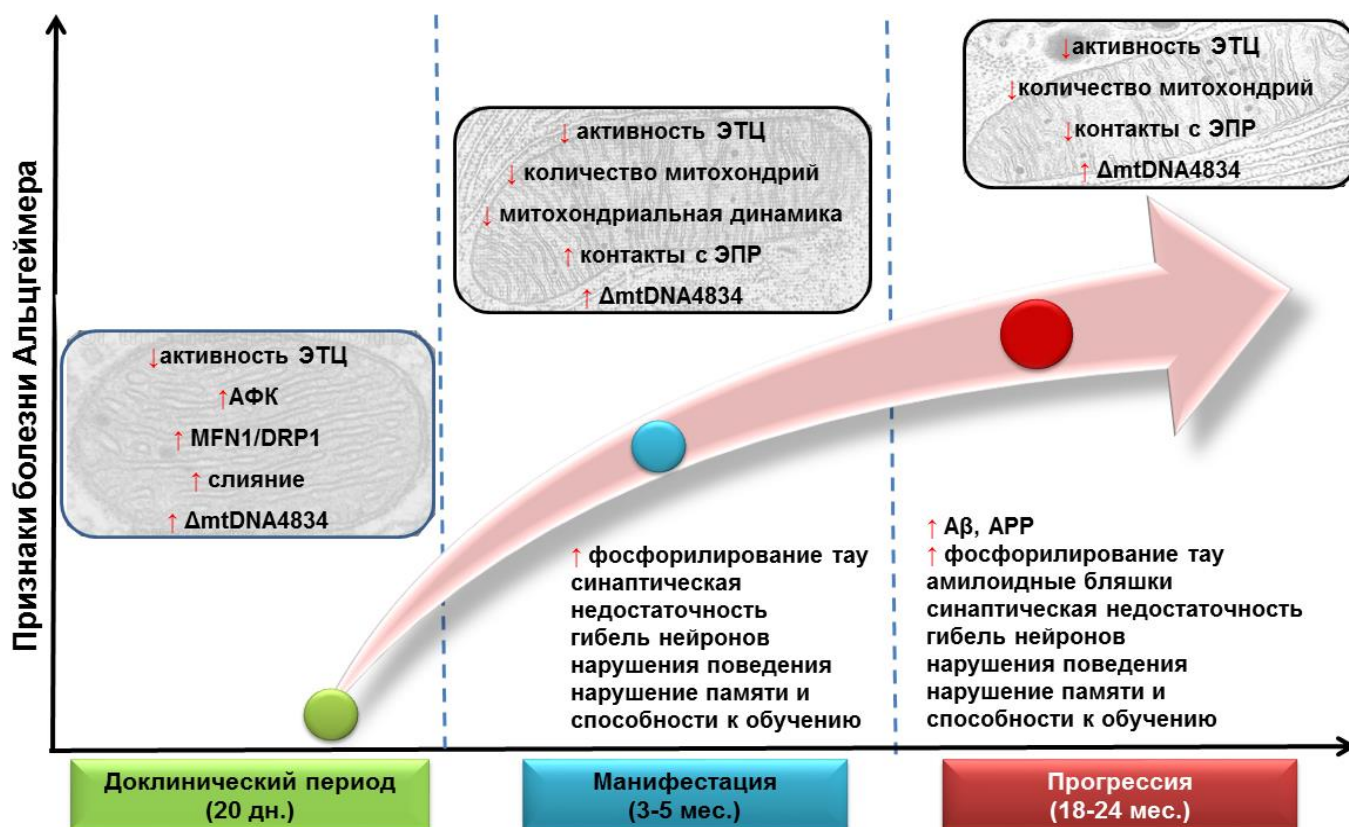
Закономерно, что в возрасте 24 месяцев содержание A $\beta$ 1-40 и A $\beta$ 1-42 в гиппокампе крыс OXYS было выше, чем у крыс Вистар ( $p = 0,001$  и  $p = 0,001$ , соответственно). Прием SkQ1 уменьшил эти показатели как в гиппокампе крыс OXYS, так и Вистар (для всех  $p < 0,001$ ).

В настоящее время принято выделять три фазы развития БА: 1) предсимптоматическая (или доклиническая) фаза; 2) фаза умеренных когнитивных, амнестических, нарушений; 3) фаза клинически выраженной деменции на фоне атрофии и гипометаболизма мозга. Очевидно, что ни одна из доступных моделей животных не воспроизводит все проявления БА у людей. В то же время у крыс OXYS спонтанно развиваются все основные признаки заболевания и в значительной степени воспроизводятся этапы развития БА. Ранее было показано, что профилактический прием адресованного в митохондрии антиоксиданта SkQ1 с доклинической стадии БА-подобной патологии (с возраста 1,5 месяцев) подавляет развитие характерных для крыс OXYS изменений поведения и дефицит пространственной памяти, замедляет патологическое накопление A $\beta$  и гиперфосфорилирование тау-белка у 23-месячных крыс OXYS (Stefanova et al., 2014). В дальнейшем было показано, что SkQ1 может замедлять прогрессию развития признаков БА у крыс OXYS на стадии заболевания, которую мы можем определить как аналогичную стадии преддеменции у людей (Stefanova et al., 2016). В настоящем исследовании мы показали, что SkQ1 способен

подавлять развитие некоторых признаков БА у крыс OXYS даже на стадии значительных нейродегенеративных нарушений, а его терапевтические эффекты связаны с улучшением структурно-функциональных параметров митохондрий мозга.

### **Заключение**

Согласно предложенной Swerdlow гипотезе «митохондриального каскада», митохондриальная дисфункция является вершиной пирамиды связанных с развитием БА патологических изменений (Swerdlow et al., 2017). Наши данные позволяют предположить, что у крыс OXYS, воспроизводящих ключевые признаки спорадической формы БА (Kozhevnikova et al., 2013; Stefanova et al., 2014; Stefanova et al., 2014), митохондриальная дисфункция характеризуется ранним началом, значительно опережающим манифестацию первых признаков БА. В ходе развития признаков БА у крыс OXYS митохондриальная дисфункция также усугубляется, дополнительно способствуя прогрессии нейродегенеративных изменений (рис. 21). Таким образом, митохондриальная дисфункция может способствовать, или даже инициировать запуск молекулярных каскадов, участвующих в развитии БА, оказываясь в «основании» пирамиды ее патогенеза.



**Рис. 21.** Структурно-функциональные изменения митохондрий мозга, предшествующие и сопутствующие развитию признаков БА у крыс OXYS.

## ВЫВОДЫ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ

1. Развитию признаков БА у крыс OXYS предшествуют структурно-функциональные изменения митохондрий мозга: в возрасте 20 дней на доклинической стадии заболевания снижена по сравнению с крысами Вистар активность дыхательной цепи митохондрий мозга (за счет комплекса IV), усилено слияние митохондрий на фоне смещения баланса основных белков митохондриальной динамики - повышения содержания белка MFN1, выявляются митохондрии с характерным для пациентов с БА фенотипом – «митохондрии-на-нитке».

2. Манифестация признаков БА у крыс OXYS в возрасте 3-5 месяцев происходит на фоне значительного снижения удельного количества митохондрий в нейронах гиппокампа, их деструктивных изменений, снижения активности дыхательной цепи (за счет комплексов IV и V – в гиппокампе, комплексов I и V – в



префронтальной коре), нарушения динамики митохондрий и увеличением активности образования контактов с ЭПР.

3. У крыс OXYS с выраженными признаками БА существенно снижены удельное количество митохондрий и активность дыхательной цепи, значительно повышена доля митохондрий с выраженными деструктивными изменениями, митохондриальная динамика смещена в направлении усиления деления за счет увеличения содержания белка DRP1.

4. Анализ распределения растворимых форм амилоида бета в нейронах гиппокампа крыс OXYS в период прогрессии признаков БА показал, что он локализуется в мембранах митохондрий и их матриксе, в ядре и отростках нейронов крыс OXYS.

5. Только в возрасте 20 дней и только при окислении одного субстрата - пирувата – генерация АФК в выделенных митохондриях мозга крыс OXYS выше, чем у крыс Вистар. В период манифестации и прогрессии признаков БА у крыс OXYS отличия по этому показателю от одновозрастных крыс Вистар отсутствовали.

6. Содержание митохондриального белка-разобщителя UCP2 - регулятора генерации АФК - растет с возрастом в гиппокампе и коре мозга как у крыс Вистар, так и у OXYS при отсутствии значимых межлинейных различий при нормировании на единицу массы ткани. Однако более, чем двукратное снижение удельного количества митохондрий в нейронах гиппокампа крыс OXYS косвенно указывает на повышение плотности UCP2 на внутренней мембране митохондрий.

7. Установлено, что нейропротекторные эффекты митохондриального антиоксиданта SkQ1 связаны с его способностью улучшать структурно-функциональные параметры митохондрий даже у старых крыс OXYS с выраженными признаками БА. Прием SkQ1 (250 нмоль на кг. массы тела) с возраста 19 до 24 мес. повысил частоту образования контактов с ЭПР у крыс OXYS до уровня одновозрастных Вистар, в 2,5 раза снизил долю существенно поврежденных митохондрий, но не изменил активность митохондриальной динамики и не повлиял на количество митохондрий.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Abramov A.Y., Duchon M.R. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2005. Vol. 360, № 1464. P. 2309–2314.
2. Aksenov M. Y. et al. The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease // *Journal of Molecular Neuroscience.* 1998. Vol. 11. №. 2. P. 151-164.
3. Andziak B. et al. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat // *Aging cell.* – 2006. – Vol. 5. – №. 6. – P. 463-471.
4. Bijur G.N., Davis R.E., Jope R.S. Rapid activation of heat shock factor-1 DNA binding by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and modulation by glutathione in human neuroblastoma and Alzheimer's disease cybrid cells // *Mol. Brain Res.* 1999. Vol. 71, № 1. P. 69–77.
5. Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing // *Exp. Gerontol.* 2000. Vol. 35, № 6–7. P. 811–820.
6. Bondy S. C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue // *Neurotoxicology.* – 2010. – Vol. 31. – №. 5. – P. 575-581.
7. Bravo R. et al. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress // *J. Cell Sci.* 2011. Vol. 124, № 14. P. 2511–2511.
8. Bu G. Apolipoprotein e and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. Vol. 10, № 5. P. 333–344.
9. Cali T. et al. A-Synuclein Controls Mitochondrial Calcium Homeostasis By Enhancing Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Interactions // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 22. P. 17914–17929.
10. Campos-Esparza M.R., Sánchez-Gómez M.V., Matute C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols // *Cell Calcium.* 2009. Vol. 45, № 4. P. 358–368.

11. Cardoso S., Seiça R.M., Moreira P.I. Mitochondria as a target for neuroprotection: implications for Alzheimer's disease // *Expert Rev. Neurother.* 2017. Vol. 17, № 1. P. 77–91.
12. Cardoso S.M. et al. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances A $\beta$  toxicity // *J. Neurochem.* 2004. Vol. 89, № 6. P. 1417–1426.
13. Cerasoli E., Ryadnov M.G., Austen B.M. The elusive nature and diagnostics of misfolded A $\beta$  oligomers // *Front. Chem.* 2015. Vol. 3, № March. P. 17.
14. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions // *Chemistry and physics of lipids.* 2009. Vol. 157. №. 1. P. 1-11.
15. Charreau B. et al. Transgenesis in rats: technical aspects and models // *Transgenic research.* 1996. Vol. 5. №. 4. P. 223-234.
16. Chen H.K. et al. Apolipoprotein E4 domain interaction mediates detrimental effects on mitochondria and is a potential therapeutic target for Alzheimer disease // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 7. P. 5215–5221.
17. Chen L. et al. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure // *Cardiovasc. Res.* 2009. Vol. 84, № 1. P. 91–99.
18. Chen Y. R., Glabe C. G. Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid- $\beta$  peptide A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42: stable trimer or tetramer formation by A $\beta$ 42 // *Journal of Biological Chemistry.* – 2006.
19. Correia S. C., Perry G., Moreira P. I. Mitochondrial traffic jams in Alzheimer's disease-pinpointing the roadblocks // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* 2016. Vol. 1862. №. 10. P. 1909-1917.
20. Darvesh A.S. et al. Oxidative stress and Alzheimer's disease : dietary polyphenols as potential therapeutic agents // *Expert Rev. Neurother.* 2010. Vol. 10, № 5. P. 729–745.
21. de Leon M.J. et al. Positron emission tomographic studies of aging and Alzheimer disease // *AJNR Am J Neuroradiol.* 1983. Vol. 4, № 3. P. 568–571.

22. De Sarno P. et al. Alterations in muscarinic receptor-coupled phosphoinositide hydrolysis and AP-1 activation in Alzheimer's disease cybrid cells // *Neurobiol. Aging*. 2000. Vol. 21, № 1. P. 31–38.
23. Desler C. et al. The role of mitochondrial dysfunction in the progression of Alzheimer's disease // *Curr. Med. Chem.* 2017. Vol. 24, № October. P. 1–10.
24. Dong Y. et al. Do low-serum vitamin E levels increase the risk of Alzheimer disease in older people? Evidence from a meta-analysis of case-control studies // *International journal of geriatric psychiatry*. 2018. Vol. 33. №. 2.
25. Dotan Y. et al. Decision analysis supports the paradigm that indiscriminate supplementation of vitamin e does more harm than good // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009. Vol. 29, № 9. P. 1304–1309.
26. Drachman D.A. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease // *Alzheimer's Dement.* Elsevier Ltd, 2014. Vol. 10, № 3. P. 372–380.
27. Dysken M.W. et al. Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: The TEAM-AD VA cooperative randomized trial // *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 2014. Vol. 311, № 1. P. 33–44.
28. Eckert A., Schmitt K., Götz J. Mitochondrial dysfunction-the beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid- $\beta$  toxicity // *Alzheimer's research & therapy*. 2011. Vol. 3. №. 2. P. 15.
29. Farkas D. L. et al. Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials // *Biophysical journal*. – 1989. – Vol. 56. – №. 6. – P. 1053-1069.
30. Fornari E. et al. Demyelination of superficial white matter in early Alzheimer's disease: a magnetization transfer imaging study // *Neurobiology of aging*. 2012. Vol. 33. №. 2. P. 428. e7-428. e19.
31. Foster N.L., Chase T.N., Fedio P., Patronas N.J., Brooks R.A., Di Chiro G. Alzheimer's disease: focal cortical changes shown by positron emission tomography // *Neurology*. 1983. Vol. 33, №: Aug P. 961–965.
32. Fox N. C. et al. Effects of A $\beta$  immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease // *Neurology*. 2005. Vol. 64. №. 9. P. 1563-1572.

33. Friede R.L. Enzyme histochemical studies of senile plaques // *J Neuropathol Exp Neurol*. 1965. Vol. 24, № 3. P. 477–491.
34. Gergely P. et al. Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalinization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus // *The Journal of Immunology*. 2002. Vol. 169. №. 2. P. 1092-1101.
35. Gibson G. E. et al. Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease // *Archives of neurology*. 1988. Vol. 45. №. 8. P. 836-840.
36. Gibson G. E., Sheu K. F. R., Blass J. P. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease // *Journal of neural transmission*. 1998. Vol. 105. №. 8-9. P. 855-870.
37. Gibson G. E., Shi Q. A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multifaceted treatments // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010. Vol. 20. №. s2. P. S591-S607.
38. Goate A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. // *Nature*. 1991. Vol. 349, № 6311. P. 704–706.
39. Grimm A., Friedland K., Eckert A. Mitochondrial dysfunction: the missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease // *Biogerontology*. Springer Netherlands, 2016. Vol. 17, № 2. P. 281–296.
40. Grimm A., Eckert A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view // *Journal of neurochemistry*. – 2017. – Vol. 143. – №. 4. – P. 418-431.
41. Gugliandolo A., Bramanti P., Mazzon E. Role of vitamin e in the treatment of alzheimer's disease: Evidence from animal models // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. Vol. 18, № 12.
42. Haass C., Selkoe D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007. Vol. 8. №. 2. P. 101.

43. Hass D. T., Barnstable C. J. Uncoupling protein 2 in the glial response to stress: implications for neuroprotection //Neural regeneration research. 2016. Vol. 11. №. 8. P. 1197.
44. Harrison F. E. et al. Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wild-type mice //Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2009. Vol. 93. №. 4. P. 443-450.
45. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? //Journal of the American Geriatrics Society. – 1972. – Vol. 20. – №. 4. – P. 145-147.
46. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: A brief personal history, 1954-2009 // Biogerontology. 2009. Vol. 10, № 6. P. 773–781.
47. Head E. A canine model of human aging and Alzheimer’s disease // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2013. Vol. 1832, № 9. P. 1384–1389.
48. Hedskog L. et al. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer’s disease and related models // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. Vol. 110, № 19. P. 7916–7921.
49. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis //Nature neuroscience. 2015. Vol. 18. №. 6. P. 794.
50. Isaac M.G.E.K.N., Quinn R., Tabet N. Vitamin E for Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment ( Review ) // Cochrane Database Syst. Rev. 2008. № 3. P. 1–21.
51. Issac MG, Quinn R, Tabet N. Vitamin E for Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. Cochrane Database Syst. Rev. 3, CD002854 (2008).
52. Jayasena T. et al. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer’s disease // Ageing Res. Rev. Elsevier B.V., 2013. Vol. 12, № 4. P. 867–883.
53. Jimenez-Jimenez, F.J.; de Bustos, F.; Molina, J.A.; Benito-Leon, J.; Tallon-Barranco, A.; Gasalla, T.; Orti-Pareja, M.; Guillamon, F.; Rubio, J.C.; Arenas, J.; et al. Cerebrospinal fluid levels of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) in alzheimer’s disease. J. Neural Trans. 1997, Vol. 104, P. 703–710.

54. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2003. Vol. 1604. №. 2. P. 77-94.
55. Karran E., Mercken M., Strooper B. De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics // *Nat. Rev. Drug Discov.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 10, № 9. P. 698–712.
56. Kehrer J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity // *Toxicology*. – 2000. Vol. 149. №. 1. P. 43-50.
57. Kim W. R., Sun W. Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system // *Development, growth & differentiation*. 2011. Vol. 53. №. 2. P. 225–235.
58. Knott A.B. et al. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. Vol. 9, № 7. P. 505–518.
59. Kolosova N.G. et al. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats // *Neurobiol. Aging*. 2006. Vol. 27, № 9. P. 1289–1297.
60. Kolosova N. G. et al. The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 but not N-acetylcysteine reverses aging-related biomarkers in rats // *Aging (Albany NY)*. 2012. Vol. 4. №. 10. P. 686.
61. Kolosova N.G. et al. Antioxidant SkQ1 Alleviates signs of Alzheimer's disease-like pathology in old OXYS rats by reversing mitochondrial deterioration // *Current Alzheimer Research*. 2017. Vol. 14. №. 12. P. 1283-1292.
62. Korshunov S. S., Skulachev V. P., Starkov A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS letters*. 1997. Vol. 416. №. 1. P. 15–18.
63. Kozhevnikova O.S., Korbolina E.E., Ershov N.I., Kolosova N.G. Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy // *Cell Cycle*. 2013a. Vol.12. №.11. P.1745–1761.

64. Ksir C., Benson D.M. Enhanced Behavioral Response to Nicotine in an Animal Model of Alzheimer's Disease // *Psychopharmacology (Berl)*. 1983. № 81. P. 272–273.
65. van der Laan M. et al. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis // *Trends in cell biology*. 2012. Vol. 22. №. 4. P. 185-192.
66. Lecanu L., Papadopoulos V. Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. // *Alzheimers. Res. Ther.* 2013. Vol. 5, № 3. P. 17.
67. Liang W. S. et al. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105. №. 11. P. 4441-4446.
68. Liu C.C. et al. Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy // *Nat. Rev. Neurol.* 2013. Vol. 9, № 2. P. 106–118.
69. Lloret A. et al. Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2009. Vol. 17. №. 1. P. 143-149.
70. Lores-Arnaiz S. et al. Brain cortex mitochondrial bioenergetics in synaptosomes and non-synaptic mitochondria during aging // *Neurochem. Res.* 2016. Vol. 41, № 1–2. P. 353–363.
71. Loshchenova P.S. et al. Influence of antioxidant SkQ1 on accumulation of mitochondrial DNA deletions in the hippocampus of senescence-accelerated OXYS rats // *Biochem.* 2015. Vol. 80, № 5. P. 596–603.
72. Manczak M., Calkins M.J., Reddy P.H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: Implications for neuronal damage // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20, № 13. P. 2495–2509.
73. Markovets A. M. et al. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats // *Aging (Albany NY)*. 2011. Vol. 3. №. 1. P. 44.



74. Martins I. J. et al. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease // *Molecular psychiatry*. 2006. Vol. 11. №. 8. P. 721.
75. Massaad C. A., Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory // *Antioxidants & redox signaling*. 2011. Vol. 14. №. 10. P. 2013-2054.
76. Men'shchikova E.B. et al. Generation of reactive oxygen species by mitochondria in senescence-accelerated OXYS rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2002. Vol. 133, № 2. P. 175–177.
77. Mitsui J., Tsuji S. Genomic aspects of sporadic neurodegenerative diseases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier Inc., 2014. Vol. 452, № 2. P. 221–225.
78. Morozov Y. M. et al. Ultrastructural evidence for impaired mitochondrial fission in the aged rhesus monkey dorsolateral prefrontal cortex // *Neurobiology of aging*. – 2017. Vol. 51. P. 9-18.
79. Morris G.P., Clark I.A., Vissel B. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease // *Acta Neuropathol. Commun.* 2014a. Vol. 2, № 1. P. 135.
80. Morris J. K. et al. Is Alzheimer's disease a systemic disease? // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014b. Vol. 1842. №. 9. P. 1340-1349.
81. Mosconi L. et al. Declining brain glucose metabolism in normal individuals with a maternal history of Alzheimer disease // *Neurology*. – 2009. – Vol. 72. – №. 6. – P. 513-520.
82. Mosconi L. et al. Maternal transmission of Alzheimer's disease: prodromal metabolic phenotype and the search for genes // *Hum Genomics*. 2010. Vol. 4, № 3. P. 170–193.
83. Mosconi L. et al. Reduced mitochondria cytochrome oxidase activity in adult children of mothers with Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. Vol. 27. №. 3. P. 483-490.

84. Munkacsy E., Shane L.R. The Paradox of Mitochondrial Dysfunction and Extended Longevity // *Exp Gerontol.* 2014. Vol. 56, № Aug. P. 221–233.
85. Muraleva N. A. et al. Efficacy of glucosamine alendronate alone & in combination with dihydroquercetin for treatment of osteoporosis in animal model // *The Indian Journal of Medical Research.* 2012. Vol. 135. №. 2. P. 221.
86. Murley A., Nunnari J. The emerging network of mitochondria-organelle contacts // *Molecular cell.* 2016. Vol. 61. №. 5. P. 648-653.
87. Mutisya E. M., Bowling A. C., Beal M. F. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease // *Journal of neurochemistry.* 1994. Vol. 63. №. 6. P. 2179-2184.
88. Nakamura T. et al. Apolipoprotein E4 (1–272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells // *Molecular neurodegeneration.* 2009. Vol. 4. №. 1. P. 35.
89. Nones J. et al. Flavonoids and astrocytes crosstalking: Implications for brain development and pathology // *Neurochem. Res.* 2010. Vol. 35, № 7. P. 955–966.
90. Paolicelli R. C. et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development // *Science.* – 2011. epub 1202529.
91. Parker WD. Sporadic neurologic disease and the electron transport chain: a hypothesis. In: Pascuzzi RM, ed. *Proceedings of the 1989 Scientific Meeting of the American Society for Neurological Investigation: New Developments in Neuromuscular Disease*, Bloomington, Indiana: Indiana University Printing Services; 1990.
92. Paspalas C.D. et al. The aged rhesus macaque manifests Braak stage III/IV Alzheimer's-like pathology // *Alzheimer's Dement.* Elsevier Inc., 2017. P. 1–12.
93. Payne B. A. I., Chinnery P. F. Mitochondrial dysfunction in aging: much progress but many unresolved questions // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* 2015. Vol. 1847. №. 11. P. 1347-1353.
94. Penke B. et al. Intraneuronal  $\beta$ -amyloid and its interactions with proteins and subcellular organelles // *Electrophoresis.* 2012. Vol. 33. №. 24. P. 3608-3616.

95. Phillips N. R., Simpkins J. W., Roby R. K. Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer's brains: A review // *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. 2014. Vol. 10. № 3. P. 393-400.
96. Pinho C.M., Teixeira P.F., Glaser E. Mitochondrial import and degradation of amyloid- $\beta$  peptide // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* Elsevier B.V., 2014. Vol. 1837, № 7. P. 1069–1074.
97. Plotnikov E.Y. et al. Mild uncoupling of respiration and phosphorylation as a mechanism providing nephro- and neuroprotective effects of penetrating cations of the SkQ family. // *Biochemistry*. 2012. Vol. 77, № 9. P. 1029–1037.
98. Price J.L., McKeel Jr. D.W., Buckles V.D. et al. Neuro- pathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease // *Neurobiol. Aging*. 2009. Vol. 30. N 7. P. 1026–1036.
99. Puzzo D. et al. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A $\beta$  physiology // *Neuroscience*. IBRO, 2015. Vol. 307. P. 26–36.
100. Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's disease // *N Engl J Med*. 2010. Vol. 362. №.4. P.329–344.
101. Quijano C. et al. Interplay between oxidant species and energy metabolism // *Redox biology*. 2016. Vol. 8. P. 28-42.
102. Rabe A. et al. Learning deficit in immature rabbits with aluminum-induced neurofibrillary changes // *Exp. Neurol*. 1982. Vol. 76, № 2. P. 441–446.
103. Ristow M., Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS) // *Dose-Response*. 2014. Vol. 12, № 2. P. 288–341.
104. Ristow M., Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis) // *Experimental gerontology*. 2010. Vol. 45. №. 6. P. 410-418.
105. Robinson M.B., Jackson J.G. Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics // *Neurochem. Int.* Elsevier Ltd, 2016. Vol. 98. P. 56–71.

106. Rota C. et al. Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties. // *Nutr. Neurosci.* 2005. Vol. 8, № 1. P. 21–29.
107. Rota C. et al. Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties // *Nutritional neuroscience.* 2005. Vol. 8. №. 1. P. 21-29.
108. Rowland A.A., Voeltz G.K. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: Function of the junction // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 13, № 10. P. 607–615.
109. Ruiz-Opazo N. et al. Attenuated Hippocampus-Dependent Learning and Memory Decline in Transgenic TgAPP<sup>swe</sup> Fischer-344 Rats // *Mol. Med.* 2004. Vol. 10, № 1–6. P. 36–44.
110. Russo A. et al. Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult // *Life sciences.* 2003. Vol. 72. №. 21. P. 2369-2379.
111. Sano M. et al. A Controlled Trial of Selegiline, Alpha-Tocopherol, or Both as Treatment for Alzheimer’s Disease // *N. Engl. J. Med.* 1997. Vol. 336, № 17. P. 1216–1222.
112. Salganik R. I. et al. Inherited enhancement of hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in the S strain rats results in DNA rearrangements, degenerative diseases, and premature aging // *Biochemical and biophysical research communications.* 1994. Vol. 199. №. 2. P. 726-733.
113. Sawikr Y. et al. Neuroinflammation in Alzheimer’s Disease: The Preventive and Therapeutic Potential of Polyphenolic Nutraceuticals // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 1st ed. Elsevier Inc., 2017. Vol. 108. P. 33-57.
114. Schaefer P.M. et al. Metabolic characterization of intact cells reveals intracellular amyloid beta but not its precursor protein to reduce mitochondrial respiration // *PLoS One.* 2016. Vol. 11, № 12. P. 1–23.
115. Schon E. A., Area-Gomez E. Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease // *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2013. Vol. 55. P. 26-36.

116. Sebastián D., Palacín M., Zorzano A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging // Trends Mol. Med. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 23, № 3. P. 201–215.
117. Selkoe D. J. Soluble Oligomers of the Amyloid  $\beta$ -Protein: Impair Synaptic Plasticity and Behavior // Synaptic Plasticity and the Mechanism of Alzheimer's Disease. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. P. 89-102.
118. Sergeeva S. et al. Development of behavioural dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism // Exp. Gerontol. 2006. Vol. 41, № 2. P. 141–150.
119. Serrano-Pozo A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2011. Vol. 1. №. 1., a006189.
120. Severin F.F. et al. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore // Proc. Natl. Acad. Sci. 2010. Vol. 107, № 2. P. 663–668.
121. Shabalina I. G. et al. Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1 // Aging (Albany NY). – 2017. Vol. 9. №. 2. P. 315.
122. Sheehan J. P. et al. Calcium homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's disease // Journal of Neuroscience. 1997. Vol. 17. №. 12. P. 4612-4622.
123. Sheng Z. H., Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration // Nature Reviews Neuroscience. 2012. Vol. 13. №. 2. P. 77.
124. Shimohama S. et al. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. Vol. 273, № 1. P. 5–9.
125. Silva D. F. et al. Bioenergetic flux, mitochondrial mass and mitochondrial morphology dynamics in AD and MCI cybrid cell lines // Human molecular genetics. 2013. Vol. 22. №. 19. P. 3931-3946.
126. Sorbi S., Bird E. D., Blass J. P. Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain // Annals of neurology. 1983. Vol. 13. №. 1. P. 72-78.

127. Spuch C., Ortolano S., Navarro C. New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria //Journal of aging research. 2012. Vol. 2012.
128. Stefanova N. et al. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease //Cell cycle. 2014. Vol. 13. №. 6. P. 898-909.
129. Stefanova N.A. et al. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 // J. Alzheimer's Dis. 2014. Vol. 38, № 3. P. 681–694.
130. Stefanova N. A. et al. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats //Oncotarget. 2015. Vol. 6. №. 3. P. 1396.
131. Stefanova N.A., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats // J. Alzheimer's Dis. 2010. Vol. 21, № 2. P. 479–491.
132. Stuart J. A. et al. A midlife crisis for the mitochondrial free radical theory of aging //Longevity & healthspan. – 2014. – Vol. 3. – №. 1. – P. 4.
133. Swerdlow R. et al. Brain glucose metabolism in Alzheimer's disease //The American journal of the medical sciences. 1994. Vol. 308. №. 3. P. 141-144.
134. Swerdlow R.H. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. Elsevier B.V., 2011. Vol. 1812, № 12. P. 1630–1639.
135. Swerdlow R.H. Mitochondria and Cell Bioenergetics: Increasingly Recognized Components and a Possible Etiologic Cause of Alzheimer's Disease // Antioxid. Redox Signal. 2012. Vol. 16, № 12. P. 1434–1455.
136. Tabira T. Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies //The Tohoku journal of experimental medicine. 2010. Vol. 220. №. 2. P. 95-106.
137. Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice // Neurochem. Res. 2009. Vol. 34, № 4. P. 639–659.

138. Tatsuta T., Langer T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing //The EMBO journal. 2008. Vol. 27. №. 2. P. 306-314.
139. Thangavel R. et al. Glia maturation factor and mitochondrial uncoupling proteins 2 and 4 expression in the temporal cortex of Alzheimer's disease brain //Frontiers in aging neuroscience. 2017. Vol. 9. P. 150.
140. Thies W., Bleiler L. 2011 Alzheimer's disease facts and figures // Alzheimer's Dement. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 7, № 2. P. 208–244.
141. Trimmer P. A. et al. Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines //Experimental neurology. 2000. Vol. 162. №. 1. P. 37-50.
142. Tyumentsev M. A. et al. Mitochondrial Dysfunction as a Predictor and Driver of Alzheimer's Disease-Like Pathology in OXYS Rats // Journal of Alzheimer's Disease. 2018. Vol. 63 №. 3. P. 1075-1088.
143. Vays V.B., Eldarov C.M., Vangely I.M., Kolosova N.G., Bakeeva L.E., Skulachev V.P. Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure // Aging (Albany NY). 2014. Vol.6. №.2. P. 140–148.
144. Wallace D.C., Fan W., Procaccio V. Mitochondrial Energetics and Therapeutics // Annu Rev Pathol. 2011. № 5. P. 297–348.
145. Walsh M.E., Shi Y., Remmen H. Van. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents // Free Radic Biol Med. 2014. Vol. January, № 66. P. 88–99.
146. Walton N. M. et al. Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress //PloS one. 2012. Vol. 7. №. 4. P. e35264.
147. Wang X., Su B., Fujioka H., Zhu X. Dynamin-like protein 1 reduction under lies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients // Am J Pathol. 2008a. Vol.173. №.2. P. 470–482.
148. Wang X., Su B., Siedlak S.L., Moreira P.I., Fujioka H., Wang Y., Casadesus G., Zhu X. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via

- differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins // Proc Natl Acad Sci U S A. 2008b. Vol.105. №.49. P.19318–19323.
149. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 2012. Vol. 1817. №. 10. P. 1833-1838.
150. Wottschalk W.K. et al. The broad impact of TOM40 on neurodegenerative diseases in aging // J Park. Dis Alzheimers Dis. 2015. Vol. 1, № 1. P. 1–25.
151. Wu H.-Y. et al. Amyloid  $\beta$  Induces the Morphological Neurodegenerative Triad of Spine Loss, Dendritic Simplification, and Neuritic Dystrophies through Calcineurin Activation // J. Neurosci. 2010. Vol. 30, № 7. P. 2636–2649.
152. Youle R. J., Van Der Bliek A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress //Science. 2012. Vol. 337. №. 6098. P. 1062-1065.
153. Zhang L. et al. Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № August. P. 18725.
154. Zhu J., Chu C. T. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease //Journal of Alzheimer's Disease. 2010. Vol. 20. №. s2. P. S325-S334.
155. Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Егоров М.В. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга). // Биохимия 2008. №.12. С.1607-1621.
156. Жданкина А. А. и др. Клинико-морфологические особенности хориоретиальной дегенерации у преждевременно стареющих крыс линии OXYS //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 146. №. 10. С. 435-438.
157. Колосова Н. Г. и др. Преждевременно стареющие крысы OXYS как модель сенильной катаракты человека //Успехи геронтологии. 2003. Т. 12. С. 143-148.
158. Лощенова П.С. и др. Накопление делеций в ДНК митохондрий гиппокампа преждевременно стареющих крыс OXYS и влияние на него антиоксиданта SkQ1 // Биохимия. 2015. Т. 80, № 5. С. 707–715.



159. Меньшикова Е. Б. и др. Генерация активированных кислородных метаболитов митохондриями преждевременно стареющих крыс OXYS //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 133. №. 2. С. 207-210.
160. Нероев В.В., Архипова М.М., Бакеев Л.Е., Фурсова А.Ж., Григорян Э.Н., Гришанова А.Ю., Иомдина Е.Н., Иващенко Ж.Н., Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Килина О.В., Колосова Н.Г., Копенкин Е.П., Коршунов С.С., Ковалева Н.А., Новикова Ю.П., Филиппов П.П., Пилипенко Д.И., Робустова О.В., Сапрунова В.Б., Сенин И.И., Скулачев М.В., Сотникова Л.Ф., Стефанова Н.А., Тихомирова Н.К., Цапенко И.В., Щипанова А.И., Зиновкин Р.А., Скулачев В.П. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Связанные с возрастом заболевания глаз. 1. SkQ возвращает зрение слепым животным // Биохимия. 2008. Т. 73, № 12. С. 1641–1654.
161. Соловьева Н. А., Морозкова Т. С., Салганик Р. И. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей //Генетика. 1975. Т. 975. №. 5. С. 63-71.
162. Стефанова Н. А. и др. Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS //Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19. №. 4. С. 445-454.
163. Шабалина И. Г. и др. Активность окислительного фосфорилирования, F0F1-АТФазы и содержание цитохромов митохондрий печени крыс с врожденным повышением способности радикалообразования //Биохимия. 1995. Т. 60. №. 12. С. 2045-2052.