



УДК 612.825

Изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера при развитии болезни Альцгеймера у мышей



Е. М. Зинченко, М. М. Климова, А. А. Широков, Н. А. Наволокин,
Д. В. Мартынов, Т. С. Антонова, И. А. Блохина, И. М. Агранович,
А. В. Терсков, О. В. Семячкина-Глушковская

Зинченко Екатерина Михайловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры консультативной психологии факультета психологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Odonata1108@yandex.ru

Климова Мария Максимовна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, mari-1997@mail.ru

Широков Александр Александрович, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии, руководитель Центра коллективного пользования «Симбиоз», Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov_a@ibppm.ru

Наволокин Никита Александрович, ассистент кафедры патологической анатомии, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, nik-navolokin@yandex.ru

Мартынов Дмитрий Валерьевич, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, martinow.dmitr@yandex.ru

Антонова Татьяна Сергеевна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, titatiana@gmail.com

Блохина Инна Андреевна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, inna-474@yandex.ru

Агранович Илана Михайловна, аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilana.agranovich@yandex.ru

Терсков Андрей Витальевич, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, terskow.andrey@gmail.com

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glushkovskaya@mail.ru

На мышах с инъекционной моделью болезни Альцгеймера оценивали детекцию β -амилоида в тканях мозга с использованием иммуногистохимического и конфокального анализа. Показано, что в экспериментальной группе отмечается скопления токсичного белка у мышей в различных зонах мозга, преимущественно в коре больших полушарий и в гиппокампе (место введения бета-амилоида). Для подтверждения развития болезни были проведены нейрофункциональные тесты. Установлено, что β -амилоид оказывает значимое патогенное воздействие на общее развитие сенсорной, двигательной, координаторной сфер, а также вызывает нарушение памяти у животных. Оценка состояния гематоэнцефалического барьера с применением флуоресцентного β -амилоида и конфокальной микроскопии выявила нарушения в барьерной функции мозга, что выразилось в выходе патогенного белка в ткани мозга. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения инъекционной модели болезни Альцгеймера у мышей для изучения негенетических механизмов развития нейродегенеративного заболевания, ассоциированных с нарушением барьерной функции мозга.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, β -амилоид (A β), иммуногистохимический и конфокальный анализ, нейропсихологические функции, гематоэнцефалический барьер, мыши.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-4-427-439>

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой нейродегенеративное заболевание и является одной из самых частых причин развития деменции у лиц пожилого и старческого возраста, характеризующейся нарушением когнитивных функций [1–4]. В настоящее время от этого заболевания страдает примерно 47 млн человек в возрасте 65 лет и старше [4, 5], согласно мировым тенденциям в ближайшие 30 лет можно ожидать увеличения числа больных БА в 3–4 раза, до 131,5 млн человек в 2050 г. [5, 6]. При БА нейродегенерация развивается преимущественно в базальных ядрах Мейнерта, гиппокампе и фронтальной коре. Дегенерирующие популяции нейронов модулируют двигательные акты, обучение, память, обработку сенсорной информации и процессы принятия решений [7–9].



В настоящее время существует несколько гипотез патогенеза БА. Наиболее признанной стала «амилоидная гипотеза», согласно которой развитие и прогрессирование БА связано с накоплением в тканях мозга токсичного белка β -амилоида [10, 11]. Указанные отложения способствуют снижению числа синапсов и развитию когнитивного дефицита при БА [5, 7, 12–18]. Одной из причин может быть нарушение кальциевого гомеостаза, участвующего в проведении импульса в синапсах, в силу чего нарушаются процессы функционального взаимодействия нервных центров и, как следствие, развиваются деменция и когнитивная слабость [19–22]. Генетическая обусловленность БА также рассматривается как важная причина патогенеза болезни [23–26].

В последнее время отмечается значительный прогресс в понимании механизмов развития БА, а также в диагностике патофизиологических проявлений патологии. Но, к сожалению, на данный момент не существует лечения, способного повернуть вспять или хотя бы остановить прогрессирование нейродегенеративного процесса при БА, а существующая фармакотерапия является симптоматической [27].

Как одна из причин прогрессирования БА рассматривается нарушение барьерной функции мозга. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) контролирует транспорт продуктов метаболизма в мозг, определяет устойчивость его клеток к воздействию повреждающих факторов. Считается, что нарушение проницаемости ГЭБ для β -амилоида приводит к тому, что белок плохо выводится из тканей мозга в кровь [28]. Есть клинические данные, указывающие на тот факт, что неинвазивное открытие ГЭБ с помощью фокусного ультразвука оказывает терапевтические эффекты в отношении симптомов болезни Альцгеймера [28]. В опытах на животных также было выявлено, что открытие ГЭБ приводит к улучшению памяти у животных и снижению отложения β -амилоида в тканях мозга [29–31].

Вместе с тем есть научные работы, указывающие на тот факт, что развитие БА сопровождается высокой проницаемостью ГЭБ [32–34].

Данные, полученные методами высокоразрешающей нейровизуализации, продемонстрировали нарушение проницаемости ГЭБ в гиппокампе и многочисленных областях серого и белого вещества у лиц с небольшими когнитивными нарушениями [34–38]. Развитие данной патологии связано с токсичностью β -амилоида в отношении эндотелиоцитов и дальнейшим развитием нейровоспаления и цитокининдуцированным повреждением клеток – компонентов ГЭБ [39].

Таким образом, патология ГЭБ представляет собой один из ключевых факторов развития нейродегенеративного заболевания.

При этом открытие ГЭБ рассматривается как ранний признак развития БА [40], но противоречит данным о возможности применения технологии неинвазивного открытия ГЭБ с целью лечения БА. Тем не менее в настоящее время отсутствуют данные о связи клеточно-молекулярных механизмов, контролирующих проницаемость ГЭБ, с процессами нейродегенерации. Изучение данного вопроса поможет разработать эффективные методы фармакотерапии, направленные на длительную нейропротекцию при БА и ограничение развития когнитивных дисфункций.

В последнее время также уделено большое внимание фактору роста нервов (NGF), который играет важную роль в развитии БА. Обнаружено изменение его содержания в тканях мозга при различных нейродегенеративных заболеваниях [41, 42]. NGF препятствует образованию амилоидных бляшек и нейрофибриллярных сплетений в головном мозге путем подавления образования белка – предшественника амилоида (APP) и гиперфосфорилирования тау-белка, образующего нейрофибриллярные белки [43, 44].

В экспериментальных исследованиях было показано, что непосредственное введение NGF в структуры мозга противодействует дегенерации холинергических нейронов, обеспечивая сохранение их биохимического и морфологического фенотипа, а также восстанавливает нарушенные когнитивные функции [45, 46]. Однако использование нативного NGF в клинике связано с определенными трудностями, а именно с его плохой способностью проникать через ГЭБ и плейотропностью [47]. В связи с этим ведутся разработки по созданию низкомолекулярных миметиков факторов роста [48–50]. Так, например, ГК2 (низкомолекулярный миметик, синтезированный ФГБУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАН) свободно проходит через гематоэнцефалический барьер и способен восстанавливать высшие психические функции у животных [47]. Учитывая, что NGF и низкомолекулярные миметики обладают антиамилоидогенной активностью, снижая накопление β -амилоида [51], можно предположить его дальнейшее выведение из тканей мозга за счет очистительной системы. В данном случае речь идет о лимфатических сосудах головного мозга.

С целью исследования изменения барьерной функции мозга при развитии БА в данной работе изучали проницаемость ГЭБ к флуоресцентному β -амилоиду у мышей с использованием инъ-



екционной модели патологии с применением конфокального и иммуногистохимического анализа присутствия и распределения токсичного β -амилоида в тканях мозга.

Материалы и методы

Объекты исследования. Во всех экспериментах использовали самцов мышей (20–25 г). Животные содержались в стандартных лабораторных условиях при температуре $25 \pm 2^\circ \text{C}$, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет/темнота. Протокол эксперимента был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протоколы № 10 и 11 от 26.11.2018).

В ходе исследования было выделено 3 группы животных: 1-я группа – контроль (интактные животные) – K1; 2-я группа – животные с экспериментальной моделью БА – Э; 3-я группа – ложнопериоперированные животные (PBS) – K2. $N = 10$ в каждой группе.

Моделирование БА осуществляли интрагиппокампальным введением β -амилоида 1-42 (Sigma-Aldrich, USA), который растворяли в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации $50 \mu\text{M}$ с последующей агрегацией в термостате при 37°C в течение 5–7 дней. Мышам вводили по 1 мкл в СА1 зону гиппокампа билатерально (суммарно 2 мкл на мышшь) согласно стереотаксическим координатам: $ML \pm 1,3 \text{ мм}$, в $AP - 2,0 \text{ мм}$, $DV - 1,9 \text{ мм}$.

Иммуногистохимический и конфокальный анализ. При иммуногистохимическом исследовании применяли систему детекции REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System с антителами фирмы ABCAM в разведении к антителу 1:100. Использовали кроличьи поликлональные антитела к β -амилоиду (ab10148). При окраске с иммуногистохимическим маркером использовали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

Для конфокальной микроскопии отложений β -амилоида (A β) мозг удаляли и фиксировали в 4% параформальдегиде / PBS в течение двух дней и в 30% сахарозе в течение еще одного дня. Очаги A β на свободно плавающих участках оценивались с использованием стандартного метода одновременного комбинированного окрашивания (протокол Abcam). Срезы тканей мозга толщиной 50 мкм делали на вибротоме (Leica VT 1000S Microsystem) и блокировали в 10% BSA/0.2% Тритон X-100/PBS в течение 2 ч, затем выдерживали в течение ночи при 4°C с анти-A β антителами (1:100, Abcam, ab10148, Cambridge,

USA), а затем 2 ч при комнатной температуре. После 3-кратной промывки в PBS по 10 мин, срезы инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с флуоресцентно-мечеными вторичными антителами в 1% BSA / 0.2% Triton X-100 / PBS (1:500; Goat A/Rb, Alexa 555-Abcam, UK, ab150078). Далее срезы отмывали трехкратно в PBS по 10 мин и помещали под покровные стёкла в 50% глицерин / PBS. Конфокальную микроскопию коры головного мозга мышей проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica SP5 (Leica, Германия) на базе ЦКП «СИМБИОЗ» ИБФРМ РАН в рамках научно-исследовательской темы № АААА-А17-117102740097-1.

Количественный анализ отложения бета-амилоида в тканях мозга и в глубоком шейном лимфоузле по результатам иммуногистохимической (ИГХ) окраски на маркер A β проводился на микроскопической системе с автоматическим анализом полученных фотографий Ariol SL50 (Genetix, UK). С помощью программного модуля PathVysion (Vysis, Inc. Applied Imaging) определяли общую площадь окраски ИГХ тестов по всему гистологическому препарату.

Для изучения патоморфоза БА применяли морфологические и морфометрические методы, использовали окраску гистологических срезов гематоксилином и эозином. При окраске с ИГХ маркерами использовали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, окрашивание на каждый маркер проводилось для всех образцов тканей одновременно для создания стандартизации условий окраски и повышения объективности полученных результатов. Все морфометрические исследования проводили с помощью Микровизора медицинского проходящего света $\mu\text{Vizo-103}$ (ЛОМО) при увеличении 774. Исследование выполнено на базе кафедры патологической анатомии Саратовского государственного медицинского университета имени В. И. Разумовского.

Функциональные тесты для оценки состояния нервной системы.

Тест «Открытое поле». Тест предназначен для исследования поведения грызунов в новых/стрессогенных условиях, используется для оценки выраженности элементов поведения (например, нарушений двигательной активности); уровня эмоционально-поведенческой реактивности животного (изменение времени «замирания» грызуна, частота груминга); стратегии исследовательского/оборонительного поведения; вегетативной дисфункции (частота урикации,



дефекации). Проведение теста «открытого поля» осуществлялось в квадратной площадке площадью 1 м² с бортами высотой 45 см. Испытуемое животное находилось в тесте в течение 8 мин, грызун помещался в центр площадки, фиксировался латентный период (в первые 5 мин от начала теста поведение животных обусловлено в большей степени стрессом и чувством страха), затем после адаптации определяли исследуемые параметры в течение 3 последних минут. Обращали внимание на такие параметры, как время замирания, число подъемов на задние лапы (стойки), время движений по горизонтальной плоскости, количество грумингов, после проведения теста регистрировали в протоколе количество дефекаций (болюсов) и уринаций.

Определение неврологического статуса животных. Определение неврологического статуса проводится по общепринятой шкале оценки выраженности неврологического дефицита (Neurological Severity Scores – NSS) в модификации для крыс. Данный тест оценивает способность животного выполнить 10 различных задач, связанных с базовыми рефлексам, а также способностью к движению и сохранению равновесия. Один балл присваивается за невыполнение задачи, таким образом, нормальное здоровое животное должно иметь 0 баллов по всем пунктам шкалы.

Социальный пятипопыточный тест. Этот тест позволяет оценить процессы узнавания новой особи. При частых встречах грызуны привикают друг к другу и тратят меньше времени на узнавание, чем при интересе к абсолютно новой крысе. В качестве стимулов применяли животных того же возраста, пола и веса, что и испытуемые, лишенных предварительных контактов с ними. Для исследования одного животного использовалось два стимула: во время тестирования проводятся 4 короткие «встречи» одного и того же стимула в клетке, а при последней, пятой попытке, в эту же клетку помещается новый грызун. Каждая сессия длилась одну минуту для социального взаимодействия (с параллельной видеорегистрацией), между сессиями проводился 10-минутный перерыв.

Тест на распознавание нового объекта. Данный тест основан на стремлении крыс исследовать новый объект взамен знакомого ранее, что отражает процессы изучения, распознавания и запоминания. Для проведения исследования в клетку к животному помещались два одинаковых предмета (кубики), далее шла 10-минутная сессия (с видеорегистрацией), в ходе которой животное запоминало новые объекты и привы-

кало к ним. Затем животное изымалось из клетки, один кубик менялся на другой, незнакомый ранее объект (шарик). Крысу возвращали на место, и далее шла вторая 10-минутная сессия. В ходе обеих сессий регистрировалось время (в секундах), затраченное на исследование новых и уже знакомых объектов.

Анализ проницаемости ГЭБ. Для анализа проницаемости ГЭБ использовали флуоресцентный бета-амилоид (a fluorescent (HiLyte™ Fluor 488)-labeled β -Amyloidpeptide). Для детектирования бета-амилоида в сосудах/тканях мозга использовали конфокальную микроскопию срезов мозга мыши толщиной 50–60 мкм. Экспрессию антигенов на срезах оценивали с использованием стандартного метода одновременного комбинированного окрашивания (протокол Abcam). Срезы мозга фиксировали в 150 мкл 10% BSA / 0,2% Triton X-100 / PBS в течение 2 ч, затем их инкубировали в течение ночи при 4° С с кроличьими анти-мышинными анти-ламинин и анти-GFAP (1:40 и 1: 200, Santa Cruz Biotechnology, Санта-Круз, США соответственно) антителами. Для анализа использовали конфокальный микроскоп TCS SP5 (Leica-microsystems, Германия) на базе центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН) г. Саратова.

Статистическая обработка экспериментальных данных. При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах проверяли при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Для сравнения средних полученных показателей был использован критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Весь статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics 22.

Результаты и их обсуждение

Результаты конфокального и иммуногистохимического анализа. Для подтверждения развития болезни Альцгеймера использовали конфокальный и иммуногистохимический анализ, который был проведен на 7-й день после введения бета-амилоида в мозг животных. На рис. 1, а и б видно наличие бета-амилоидных бляшек в тканях мозга и субарахноидальном пространстве, что отображено в виде красных точек (скопления). Аналогичные результаты были получены

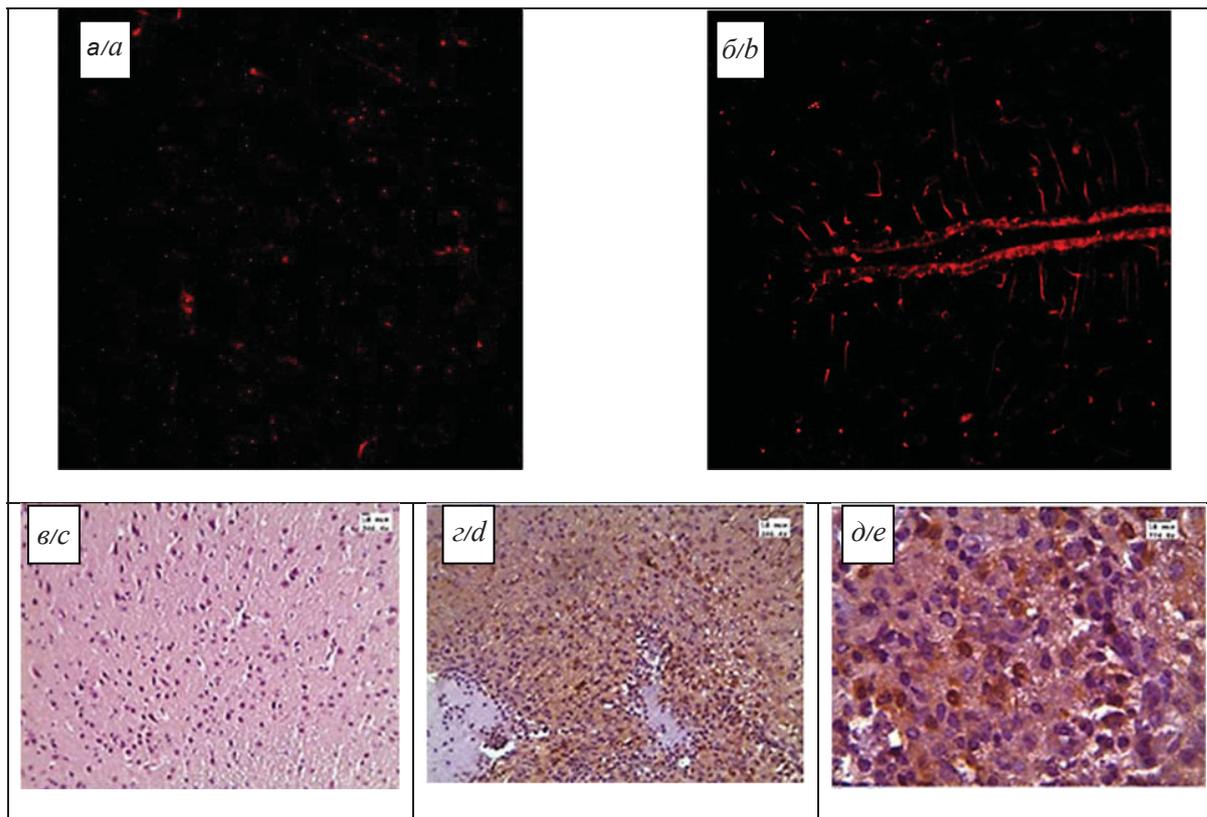


Рис. 1. Признаки развития болезни Альцгеймера у мышей по данным конфокального и иммуногистохимического анализа накопления бета-амилоида в тканях мозга мышей на 7-й день после инъекции токсичного белка в гиппокамп: *a* и *б* – бета-амилоид в тканях мозга мыши и в субарахноидальном пространстве соответственно (красный цвет – флуоресцентный сигнал от бета-амилоида); *в* – морфологическая картинка нормы тканей мозга; *г* и *д* – накопление бета-амилоида в тканях мозга на большом (246.4 ×) и малом (774.0 ×) увеличении. Окраска гематоксилином и эозином. *N* = 10 в каждой группе
 Fig. 1. Signs of Alzheimer's disease in mice according to confocal and immunohistochemical analysis of beta-amyloid accumulation in the brain tissues of mice on 7 day after injection of toxic protein into the hippocampus: *a* and *b* – beta-amyloid in the mouse brain tissues and in the subarachnoid space, respectively (red color – fluorescent signal from beta-amyloid); *c* – morphological picture of the norm of brain tissue; *d* and *e* – accumulation of beta-amyloid in brain tissues at high (246.4 ×) and small (774.0 ×) magnification. Stained with hematoxylin and eosin. *N* = 10 in each group

и при проведении иммуногистохимического анализа. На рис. 1, *в* представлена нормальная ткань мозга мыши. Но после введения токсического белка наблюдается его накопление в нервной ткани (см. рис. 1, *г*, *д*), что является признаками БА. Полученные данные свидетельствуют о развитии болезни Альцгеймера с использованием инъекционной модели.

Оценка нейропсихологических функций.

Для подтверждения развития БА проводили оценку нейропсихологических функций.

Результаты теста «открытое поле» в экспериментальной модели БА. При исследовании вегетативной дисфункции в тесте «открытое поле» (табл. 1) достоверных различий по количеству болюсов дефекации и частоте уринаций выявлено не было в модели БА по сравнению с контролем.

Время, затрачиваемое на горизонтальную двигательную активность у животных 3 групп (К1, Э, К2) (48,00 ± 56,50; 33,33 ± 15,28; 55,00 ± 0,00 соответственно) и замирание

Таблица 1 / Table 1

**Вегетативные расстройства в модели БА у мышей
 Autonomic disorders in mouse in model of AD**

Признаки / Signs	Группы / Groups		
	К1	Э	К2
Кол-во болюсов дефекации, шт / Quantity of boluses of defecation, pcs	0,33 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Частота уринаций, шт. / Urination frequency, pcs	0,33 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00



(101,33 ± 67,33; 80,67 ± 54,05; 92,00 ± 0,00 соответственно), существенно не отличалось. Также не было обнаружено значимых различий по количеству вертикальных стоек, которые совершали животные в момент прохождения этого теста

(рис. 2). Касательно длительного и короткого груминга, стоит сказать, что наблюдается тенденция увеличения его количества у мышей с моделью БА, что может свидетельствовать о замещении проявления других форм поведения.

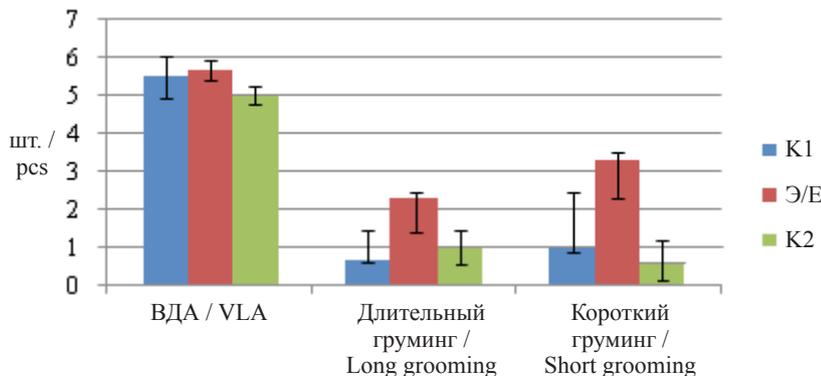


Рис. 2. Оценка вертикальной двигательной активности и груминга у мышей контрольной (K1 и K2) и экспериментальной (Э) групп в экспериментальной модели БА
 Fig. 2. Evaluation of vertical motor activity and grooming in mice of the control (K1 and K2) and experimental (E) groups in an experimental model of BA

Таким образом, в тесте «открытое поле» у животных с БА не выявлено вегетативной дисфункции и признаков гиперактивности/стереотипного поведения, задержки психического развития.

Исследование неврологических рефлексов. Оценка неврологического статуса животных по шкале NSS (табл. 2) выявила значимые различия между контрольной группой и группой с введением β-амилоида, что говорит о наличии неврологического дефицита у этих животных.

Достоверные различия по сравнению с контрольными мышами были выявлены по следующим показателям: моно/гемипарезу, рефлексу вздрагивания, балансированию на круглом стержне, движению вдоль перекладины (4 см), количеству парезов (рис. 3).

Таким образом, β-амилоид оказывает значимое патогенное воздействие на общее развитие сенсорной, двигательной, координаторной сфер.

Социальное распознавание. Одним из важных аспектов при развитии БА является изучение

социальной активности, так как нарушения в социальной сфере являются характерными для этого расстройства. Оценка участия мышей в социальных взаимодействиях с другими животными проводили с помощью теста «социальный пятипопыточный». По результатам проведения этого теста достоверных различий по социальной памяти у животных выявлено не было (рис. 4).

У животных контрольных групп наблюдается тенденция к снижению продолжительности контакта от 1-й к 4-й попытке, что связано с адаптацией к уже знакомому животному, и увеличению времени контакта в 5-й попытке при подсаживании нового интродера (нового социального «стимула»).

Оценка когнитивных функций. Память представляет собой важнейшую познавательную функцию, лежащую в основе развития и обучения. Тест на распознавание нового объекта позволяет оценить пластичность обучения и непространственную память у животных на такие свойства объектов, как текстура, форма,

Таблица 2 / Table 2

**Неврологический статус мышей по шкале NSS при экспериментальной БА
 Neurological status of mice on the NSS scale with experimental AD**

Сумма баллов по шкале NSS / Total scores on the NSS scale	Группа / Groups		
	K1	Э/Е	K2
	1,00 ± 1,26	3,67 ± 0,58 *	1,08 ± 0,87

Примечание. * – по сравнению с K1 (интактные животные), p ≤ 0,05.
 Note. * – vs. K1 (intact mice), p ≤ 0.05.

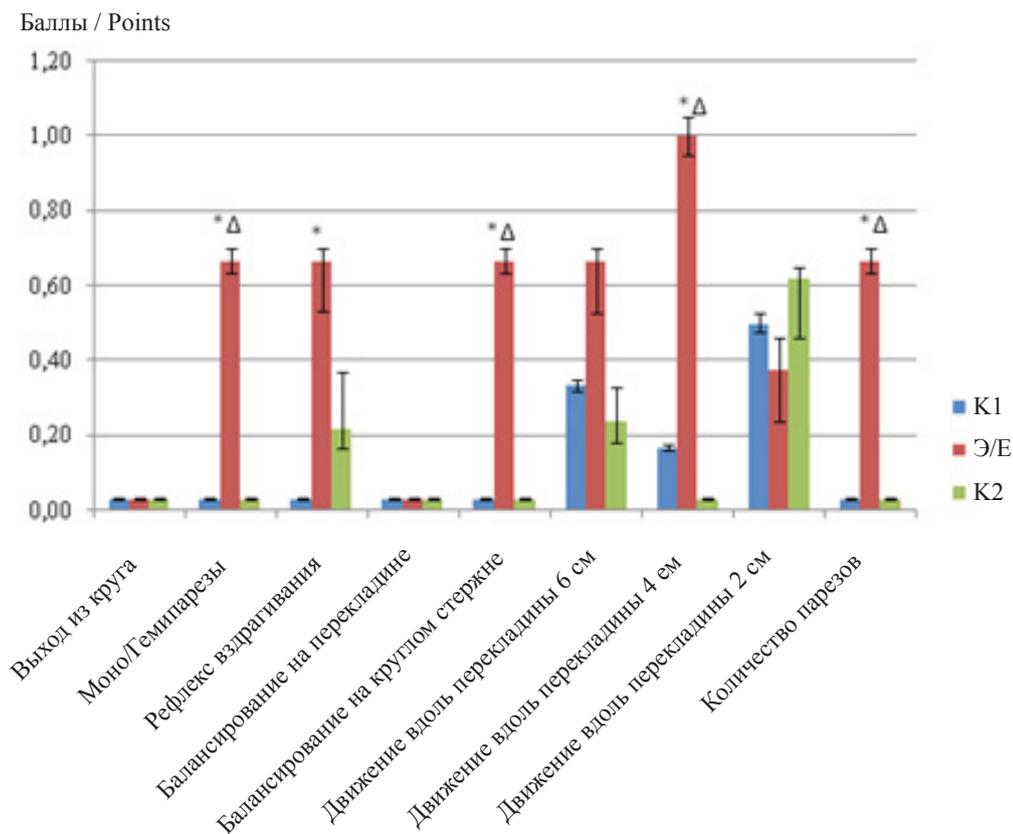


Рис. 3. Анализ неврологического статуса животных по шкале NSS (в баллах). * – по сравнению с K1 (интактные животные), Δ – по сравнению с K2 (ложнооперированные), $p \leq 0,05$

Fig.3. Analysis of the neurological status of animals on the NSS scale (in points). * – vs. K1 (intact animals), Δ – vs. K2 (sham operated), $p \leq 0.05$

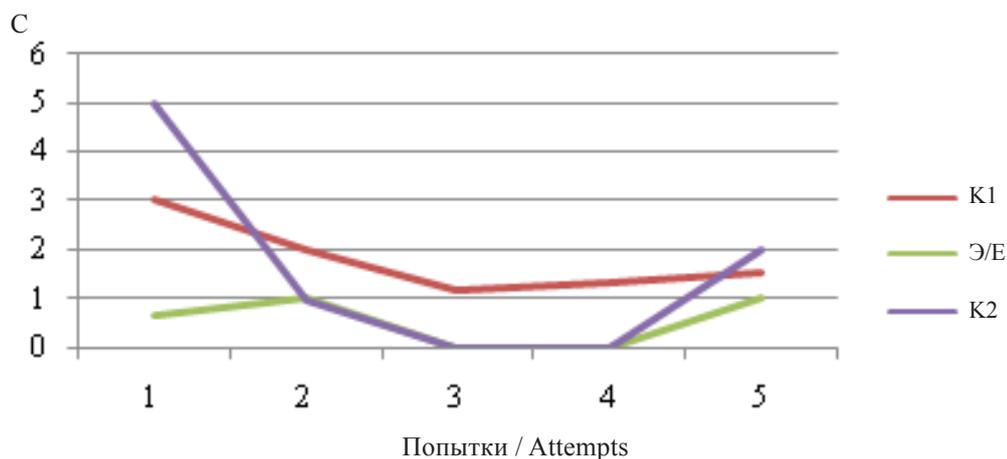


Рис. 4. Оценка социального интереса у мышей контрольной (K1 и K2) и экспериментальной (Э) групп в социальном пятипопыточном тесте при экспериментальной БА

Fig. 4. Assessment of social interest in mice of the control (K1 and K2) and experimental (E) groups in the social five-attempt test with experimental BA

запах. В данном тесте обнаружено отсутствие когнитивных расстройств у контрольных животных (рис. 5).

При этом отмечается высокая пластичность обучения, которая выражается в значимо большей продолжительности обнюхивания не-

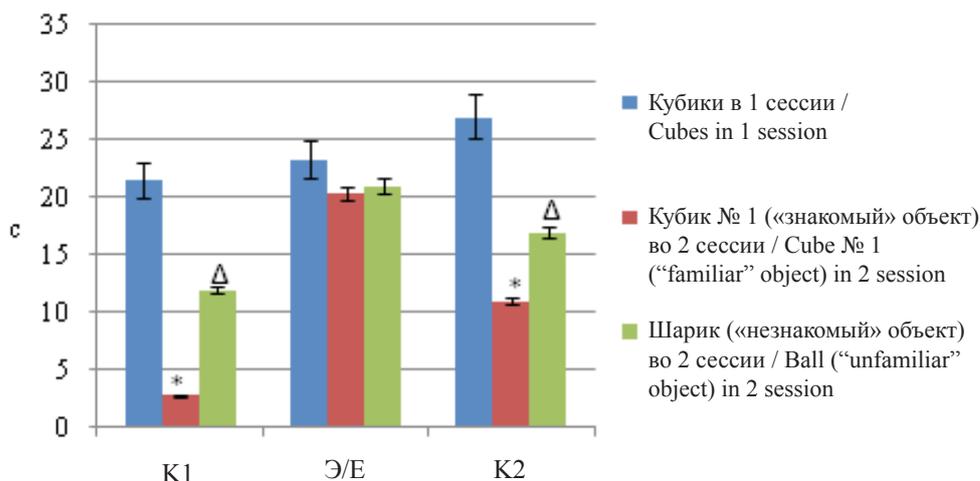


Рис. 5. Оценка непространственной памяти в тесте на распознавание нового объекта у мышей контрольной (K1 и K2) и экспериментальной (Э) групп. * – по сравнению с кубиками в 1 сессии, Δ – по сравнению с кубиком № 1 («знакомый» объект), $p \leq 0,05$

Fig. 5. Assessment of non-spatial memory in the object recognition test in mice of the control (K1 and K2) and experimental (E) groups. * – vs. cubes in 1 session, Δ – vs. cube No. 1 (“familiar” object), $p \leq 0,05$

знакомого, нового объекта, по сравнению с уже известным. У мышей экспериментальных групп, которым вводили β -амилоид, существенных различий по продолжительности обнюхивания выявлено не было, что говорит о нарушении памяти у этих животных.

Проницаемость ГЭБ при инъекционной модели БА. ГЭБ является важным показателем сосудистого гомеостаза, определяющим устойчивость клеток мозга к повреждениям. В связи с этим можно предположить, что нарушение проницаемости ГЭБ может быть одним из механизмов, определяющих развитие БА за счет выхода бета-амилоида из сосудов и накопления его в тканях мозга. Для проверки данной гипотезы оценивали нарушение барьерной функции мозга на фоне развития болезни Альцгеймера у мышей. С этой целью применяли флуоресцентный бета-амилоид с последующей оценкой его экстравазации из церебральных сосудов в ткани мозга.

Результаты данных о введении флуоресцентного бета-амилоида в контрольной и экспериментальной группах представлены на рис. 6. Как видно из рисунка, в условиях нормы флуоресцентный бета-амилоид находился в церебральных сосудах и не проникал через ГЭБ.

Однако при развитии БА отмечалось проникновение флуоресцентного бета-амилоида из крови в ткань мозга, что проявлялось в виде зеленых точек (вышедший за пределы флуоресцентный бета-амилоид) вокруг капилляров и более крупных сосудов. Отмечались очаги из

нескольких церебральных сосудов, вокруг которых наблюдалось повышение флуоресцентного сигнала, что свидетельствует о прохождении флуоресцентного бета-амилоида через ГЭБ и значительном его открытии. Это говорит о нарушении барьерной функции мозга при развитии болезни Альцгеймера.

Заключение

В экспериментах на мышах было проведено исследование по развитию болезни Альцгеймера с использованием инъекционной модели. Для этого в гиппокамп вводили бета-амилоид. Через 7 дней оценивали состояние тканей мозга с использованием иммуногистохимического и конфокального анализа. Показано, что в экспериментальной группе отмечаются скопления патологического белка, что свидетельствует о развитии БА. Также были проведены тесты для оценки нейрофункционального состояния мышей для подтверждения развития нейродегенеративного заболевания. Установлено, что β -амилоид оказывает значимое патогенное воздействие на общее развитие сенсорной, двигательной, координаторной сфер, а также вызывает нарушения памяти у животных. Для оценки состояния ГЭБ на фоне развития БА применяли флуоресцентный бета-амилоид и конфокальную микроскопию. Обнаружено, что при развитии заболевания происходит нарушение барьерной функции мозга, что выражается в экстравазации флуоресцентного бета-амилоида за пределы церебральных сосудов мыши.

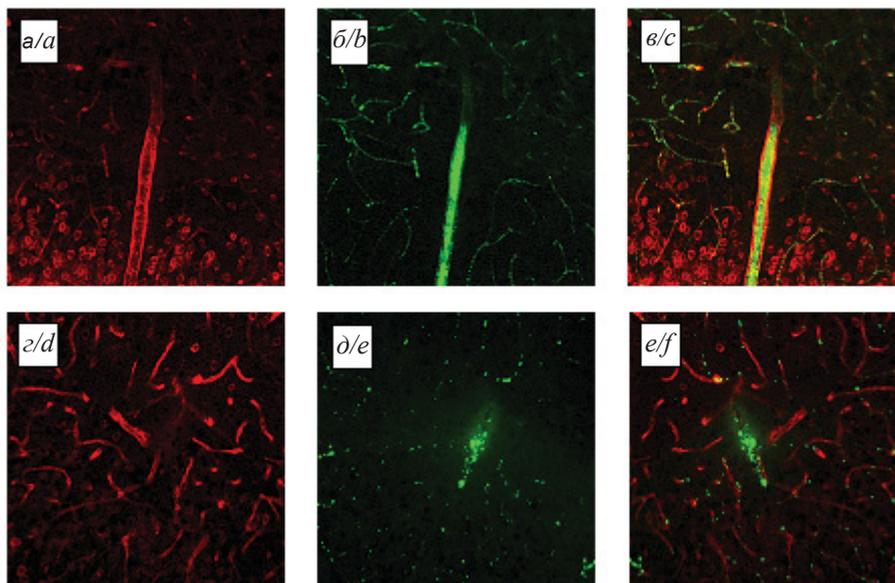


Рис. 6. Конфокальный анализ изменения проницаемости ГЭБ для флуоресцентного бета-амилоида при развитии болезни Альцгеймера у мышей: *a–в* – фото церебральных сосудов, меченных антителами к ламинину (белок базальной мембраны), где *a* – сосуды мозга (красный цвет); *b* – декстран внутри сосудов мозга (зеленый цвет); *в* – объединенное фото *a* и *b*; *г–е* – фото церебральных сосудов мышей с болезнью Альцгеймера (через 7 дней после введения бета-амилоида в гиппокамп), где *г* – церебральные сосуды (красный цвет), *д* – декстран внутри сосудов мозга и за пределами базальной мембраны; *е* – объединенное фото с *г* и *е*. $N = 10$ в каждой группе

Fig. 6. Confocal analysis of changes in the permeability of the blood-brain barrier (BBB) for fluorescent beta-amyloid in the development of Alzheimer's disease in mice: *a–c* is a photo of cerebral vessels labeled with antibodies to laminin (protein of the basement membrane), where *a* is the brain vessels (red); *b* – dextran inside the brain vessels (green); *c* – combined photo *a* and *b*; *d–f* – photo of the cerebral vessels of mice with Alzheimer's disease (7 days after beta-amyloid was introduced into the hippocampus), where *d* is the cerebral vessels (red), *e* – dextran inside the brain and outside the basement membrane; *f* – combined photo *d* and *e*. $N = 10$ in each group

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-10033).

Список литературы

1. Яхно Н. Н., Захаров В. В., Локшина А. Б., Коберская Н. Н., Мхитарян Э. А. Деменции : рук-во для врачей. 3-е изд. М. : МЕДпресс-информ, 2011. 272 с.
2. Парфенов В. А., Захаров В. В., Преображенская И. С. Когнитивные расстройства. М. : Ремедиум, 2014. 192 с.
3. Леушина А. В., Нуруллин Л. Ф., Петухова Е. О., Зефирова А. Л., Мухамедьяров М. А. Адренергические механизмы регуляции сократимости миокарда в генетической модели болезни Альцгеймера // Казан. мед. журн. 2015. Т. 96, № 1. С. 50–55.
4. Коберская Н. Н. Болезнь Альцгеймера : новые критерии диагностики и терапевтические аспекты в зависимости от стадии болезни // Медицинский совет. 2017. № 10. С. 18–24.
5. Загребин В. Л., Антошкин О. Н., Федорова О. В., Саргсян С. А. Патогенетические механизмы развития болезни Альцгеймера // Вестн. Волгоград. гос. мед. ун-та. 2016. Т. 3, № 59. С. 7–12.
6. Ubhi K., Masliah E. Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives // J. Alzheimers Dis. 2013. Vol. 33, № 1. P. 185–194.
7. Колобов В. В., Сторожева З. И. Особенности применения *in vitro*, *in silico* и трансгенных моделей болезни Альцгеймера // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2014. Т. 8, № 1. С. 34–39.
8. Graeber M. B., Moran L. B. Mechanisms of cell death in neurodegenerative disease : fashion, fiction, and facts // Brain Pathol. 2002. Vol. 12, № 3. P. 385–390.
9. Grotheet M., Heinsen H., Teipel S. J. Atrophy of the cholinergic basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease // Biol. Psychiatry. 2012. Vol. 71, № 9. P. 805–813.
10. Hardy J., Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease // Trends Pharmacol. Sci. 1991. Vol. 12, № 10. P. 383–388.
11. Mudher A., Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? // Trends Neurosci. 2002. Vol. 25, № 1. P. 22–26.



12. *Fluhreret R., Haass C.* Intramembrane proteolysis by γ -secretase and signal peptide peptidases. Intracellular traffic and neurodegenerative disorders // Springer. 2009. P. 11–26.
13. *Farooque A. A.* Neurodegeneration in neuronal trauma, neurodegenerative diseases, and neuropsychiatric disorders. Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases // Springer. 2010. P. 1–25.
14. *Farooque A. A.* Neurochemical aspects of neurodegenerative disease. Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases // Springer. 2010. P. 249–324.
15. *McDonald M. P., Dahl E. E., Overmier J. B., Mantyh P., Cleary J.* Effects of exogenous β -amyloid peptide on retention for special learning // *Behav. Neural Biol.* 1994. Vol. 62. P. 60–67.
16. *Yamada K., Nabeshima T.* Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs // *Pharmacology & Therapeutics*. 2000. Vol. 88. P. 93–163.
17. *Iqbal K., Bolognin S., Wang X., Basurto-Islas G., Blanchard J., Tung Y. C.* Animal models of the sporadic form of Alzheimer's disease : focus on the disease and not just the lesions // *J. Alzheimers Dis.* 2013. Vol. 37. P. 469–474.
18. *Demetrius L. A., Magistretti P. J., Pellerin L.* Alzheimer's disease : the amyloid hypothesis and the inverse Warburg test // *Front. Physiol.* 2015. Vol. 5. P. 2–20.
19. *Понугаева Е. А., Власова О. Л., Безprozванный И. Б.* Роль внутриклеточного кальция в развитии патогенеза болезни Альцгеймера // *Науч.-техн. ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*. 2014. Т. 1, № 189. С. 79–90.
20. *Stutzmann G. E.* The pathogenesis of Alzheimers disease is it a lifelong «calciumopathy»? // *Neuroscientist*. 2007. Vol. 13, № 5. P. 546–59.
21. *Bezprozvanny I., Mattson M. P.* Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Trends Neurosci.* 2008. Vol. 31, № 9. P. 454–63.
22. *Berridge M. J.* Neuronal calcium signaling // *Neuron*. 1998. Vol. 21, № 1. P. 13–26.
23. *Чернюк Д. П., Власова О. Л., Безprozванный И. Б., Понугаева Е. А.* Снижение числа амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей путем гиперэкспрессии белка STIM2 // *Науч.-техн. ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*. 2016. Т. 253, № 4. С. 139–149.
24. *Богачук А. П., Сторожева З. И., Телегин Г. Б., Чернов А. С., Прошин А. Т., Шерстнев В. В., Золотарев Ю. А., Липкин В. М.* Специфическая активность амидной формы пептида HLDF-6 : изучение на трансгенной модели болезни Альцгеймера // *Acta Naturae*. 2017. Т. 33, № 3. С. 68–74.
25. *Hardy J., Selkoe D. J.* The amyloid hypothesis Alzheimer's disease: progress problems theroadt therapeutics // *Science*. 2002. Vol. 297, № 5580. P. 353–356.
26. *Bergmans B. A., De Strooper B.* γ -secretases : from cell biology to therapeutic strategies // *Lancet Neurol.* 2010. Vol. 9, № 2. P. 215–226.
27. *Иптышев А. М., Горина Я. В., Лопатина О. Л., Комлева Ю. К., Салмина А. Б.* Экспериментальные модели болезни Альцгеймера : преимущества и недостатки // *Сибирское медицинское обозрение*. 2016. Т. 4, № 100. С. 5–21.
28. *Cai Z., Qiao P-F, Wan C-Q., Cai M., Zhou N-K., Li Q.* Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease // *J. Alzheimers Dis.* 2018. Vol. 63, № 4. P. 1223–1234. DOI: 10.3233/JAD-180098
29. *Burgess A., Dubey S., Yeung S., Hough O., Eterman N., Aubert I., Hynynen K.* Alzheimer disease in a mouse model : MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior // *Radiology*. 2014. Vol. 273. P. 736–745.
30. *Leinenga G., Götz J.* Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model // *Sci. Transl. Med.* 2015. Vol. 7, № 278ra33.
31. *Jordão J. F., Thévenot E., Markham-Coutles K., Scarcelli T., Weng Y. Q., Xhima K. O'Reilly M., Huang Y., McLaurin J., Hynynen K., Aubert I.* Amyloid- β plaque reduction, endogenous antibody delivery and glial activation by brain-targeted, transcranial focused ultrasound // *Exp. Neurol.* 2013. Vol. 248. P. 16–29.
32. *Sweeney M. D., Sagare A. P., Zlokovic B. V.* Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders // *Nature Reviews Neurology*. 2018. Vol. 14. P. 133–150.
33. *Montagne A., Zhao Z., Zlokovic B. V.* Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? // *J. of Exp. Med.* 2017. Vol. 214, № 6. P. 3151. DOI: 10.1084/jem.20171406
34. *Haar M. J. van de, Jansen J. F., Jeukens C. R., Burgmans S., van Buchem M. A., Muller M., Hofman P. A. M., Verhey F. R. J., van Osch M. J. P., Backes W. H.* Subtle blood-brain barrier leakage rate and spatial extent : Considerations for dynamic contrast-enhanced MRI // *Med. Phys.* 2017. Vol. 44. P. 4112–4125.
35. *Brundel M., Heringa S. M., de Bresser J., Koek H. L., Zwanenburg J. J., Kappelle L. J., Luijten P. R., Biessels G. J.* High prevalence of cerebral microbleeds at 7Tesla MRI in patients with early Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2012. Vol. 31, № 2. P. 259–263. DOI: 10.3233/JAD-2012-120364
36. *Heringa S. M., Sagare A. P., Zlokovic B. V., Koek H. L., Kappelle L. J., Biessels G. J.* Utrecht Vascular Cognitive Impairment (VCI) Study Group. Multiple microbleeds are related to cerebral network disruptions in patients with early Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2014. Vol. 38, № 1. P. 211–221. DOI: 10.3233/JAD-130542
37. *Haar M. J. van de, Burgmans S., Jansen J. F., Van Osch M. J., Van Buchem M. A., Muller M., Hofman P. A. M., Verhey F. R. J., Backes W. H.* Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease // *Radiology*. 2016. Vol. 281, № 2. P. 527–535. DOI: 10.1148/radiol.2016152244
38. *Haar M. J. van de, Jansen J. F., van Osch M. J., van Buchem M. A., Muller M., Wong S. M., Hofman P. A. M., Burgmans S., Verhey F. R. J., Backes W. H.* Neurovascular unit impairment in early Alzheimer's disease measured with magnetic resonance imaging // *Neurobiol. Aging*. 2016. Vol. 45. P. 190–196. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.006
39. *Salmina A. B., Inzhutova A. L., Malinovskaya N. A., Petrova M. M.* Endothelial dysfunction and repair in Alzheimer's type of neurodegeneration : neuronal and glial control // *J. Alzheimer's Disease*. 2010. Vol. 22, № 1. P. 17–36.
40. *Nelson A. R., Sweeney M. D., Sagare A. P., Zlokovic B. V.* Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. Vol. 1862. P. 887–900.



41. Hellweg R., Gericke C. A., Jendroska K., Hartung H. D., Cervós-Navarro J. NGF content in the cerebral cortex of nondemented patients with amyloid plaques and in symptomatic Alzheimer's disease // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1998. Vol. 16. P. 787–794.
42. Chiaretti A., Barone G., Riccardi R., Antonelli A., Pezzotti P., Genovese O., Tortorolo L., Conti G. NGF, DCX, and NSE upregulation correlates with severity and outcome of head trauma in children // *Neurology.* 2009. Vol. 72. P. 609–616.
43. Calissano P., Amadoro G., Matrone C., Ciafre, S., Marolda R., Corsetti V., Ciotti M. T., Mercanti D., Di Luzio A., Severini C., Provenzano C., Canu N. Does the term 'trophic' actually mean anti-amyloidogenic? The case of NGF // *Cell Death Differ.* 2010. № 17. P. 1126–1133.
44. Calissano P., Matrone C., Amadoro G. Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins related to Alzheimer's disease // *Dev. Neurobiol.* 2010. Vol. 70, № 5. P. 372–382.
45. Winkler J., Thal L. J. Effects of nerve growth factor treatment on rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis produced by ibotenic acid, quisqualic acid, and AMPA // *Exp. Neurol.* 1995. Vol. 136, № 2. P. 234–250.
46. Smith D. E., Roberts J., Gage F. H., Tuszyński M. H. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96, № 19. P. 10893–10898.
47. Поварнина П. Ю., Воронцова, О. Н., Гудашева, Т. А., Островская П. У., Середенин С. Б. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера // *Actanaturae.* 2013. Т. 5, № 3. С. 88–95.
48. Colangelo A. M., Bianco M. R., Vitagliano L., Cavaliere C., Cirillo G., De Gioia L., Diana D., Colombo D., Redaelli C., Zaccaro L., Morelli G., Papa M., Sarmientos P., Alberghina L., Martegani E. A new nerve growth factor-mimetic peptide active on neuropathic pain in rats // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 11. P. 2698–2709.
49. Obianyo O., Ye K. Novel small molecule activators of the Trk family of receptor tyrosine kinases // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1834. P. 2213–2218.
50. Skaper S. D. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2008. Vol. 7. P. 46–62.
51. Scarpi D., Cirelli D., Matrone C., Castronovo G., Rosini P., Occhiato E. G., Romano F., Bartali L., Clemente A. M., Bottegoni G., Cavalli A., De Chiara G., Bonini P., Calissano P., Palamara A. T., Garaci E., Torcia M. G., Guarna A., Cozzolino F. Low molecular weight, non-peptidic agonists of TrkA receptor with NGF-mimetic activity // *Cell Death Dis.* 2012. Vol. 3, № 7. P. 339.

Образец для цитирования:

Зинченко Е. М., Климова М. М., Широков А. А., Наволокин Н. А., Мартынов Д. В., Антонова Т. С., Блохина И. А., Агранович И. М., Терсков А. В., Семьякина-Глушковская О. В. Изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера при развитии болезни Альцгеймера у мышей // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2019. Т. 19, вып. 4. С. 427–439. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-4-427-439>

Changes in the Permeability of the Blood-Brain Barrier in the Development of Alzheimer's Disease in Mice

E. M. Zinchenko, M. M. Klimova, A. A. Shirokov, N. A. Navolokin, D. V. Martynov, T. S. Antonova, I. A. Blohina, I. M. Agranovich, A. V. Terskov, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya

Ekaterina M. Zinchenko, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, Odonata1108@yandex.ru

Mariya M. Klimova, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, mari-1997@mail.ru

Alexander A. Shirokov, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Entusiastov St., Saratov, 410049, Russia, shirokov_a@ibppm.ru

Nikita A. Navolokin, Saratov State Medical University, 112 Bol'shaya Kazach'ya St., Saratov 410012, Russia, nik-navolokin@yandex.ru

Dmitry V. Martynov, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, martinow.dmitr@yandex.ru

Tatyana S. Antonova, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, titatiana@gmail.com

Inna A. Blohina, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, inna-474@yandex.ru

Ilana M. Agranovich, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, ilana.agranovich@yandex.ru

Andrey V. Terskov, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, terskov.andrey@gmail.com

Oxana V. Semyachkina-Glushkovskaya, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

In our study on mice with an injection model of Alzheimer's disease (AD), beta-amyloid detection in the brain tissue was evaluated using immunohistochemistry and confocal analysis. An accumulation of toxic protein was shown in different areas of the brain, predominantly in the cortex and in the hippocampus (place of beta-amyloid injection). Neurofunctional tests were conducted to confirm the development of AD. It is uncovered that accumulation of β -amyloid in the brain was associated with development of the sensory, motor, coordinating disjunctions, and also with memory impairment in tested mice. Confocal analysis of the blood-brain barrier (BBB) permeability to fluorescent beta-amyloid revealed a significant leakage of beta-amyloid from the cerebral vessels into the brain tissues in mice with AD. The results indicate the effectiveness of the use of the Alzheimer's injection model in mice to study the non-genetic mechanisms of the development of a neurodegenerative disease associated with impaired BBB function. **Keywords:** Alzheimer's disease, β -amyloid(A β), immunohistochemical and confocal analysis, neuropsychological functions, blood-brain barrier, mice.

Acknowledgements: The work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 18-75-10033).



References

1. Yahno N. N., Zaharov V. V., Lokshina A. V., Koberskaya N. N., Mhitaryan E. A. *Demencii: ruk-vo dlya vrachej* [Dementia: a guide for doctors]. 3-e izd. Moscow, MEDpress-inform Publ., 2011. 272 p. (in Russian).
2. Parfenov V. A., Zaharov I. S. *Kognitivnye rasstrojstva* [Cognitive disorders]. Moscow, Remedium Publ., 2014. 192 p. (in Russian).
3. Leushina A. V., Nurullin L. F., Petuhova E. O., Zefirov A. L., Muhamed'yarov M. A. Adrenergic mechanisms of myocardial contractility regulation in the genetic model of Alzheimer's disease. *Kazan Medical Journal*, 2015, vol. 96, no. 1, pp. 50–55 (in Russian).
4. Koberskaya N. N. Alzheimer's disease: new diagnostic criteria and therapeutic aspects depending on the stage of the disease. *Medical Council*, 2017, no. 10, pp. 18–24 (in Russian).
5. Zagrebin V. L., Antoshkin O. N., Fedorova O. V., Sargsyan S. A. Pathogenetic mechanisms of Alzheimer's disease development. *Journal Volgograd State Medical University*, 2016, vol. 3, no. 59, pp. 7–12 (in Russian).
6. Ubhi K., Masliah E. Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives. *J. Alzheimers Dis.* 2013, vol. 33, no. 1, pp. 185–194.
7. Kolobov V. V., Storozheva Z. I. Features of in vitro, in silico and transgenic models of Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 34–39 (in Russian).
8. Graeber M. B., Moran L. B. Mechanisms of cell death in neurodegenerative disease: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol.*, 2002, vol. 12, no. 3, pp. 385–390.
9. Grothet M., Heinsen H., Teipel S. J. Atrophy of the cholinergic basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*, 2012, vol. 71, no. 9, pp. 805–813.
10. Hardy J., Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, vol. 12, no. 10, pp. 383–388.
11. Mudheret A., Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.*, 2002, vol. 25, no. 1, pp. 22–26.
12. Fluhreret R., Haass C. Intramembrane proteolysis by γ -secretase and signal peptide peptidases. Intracellular traffic and neurodegenerative disorders. *Springer*, 2009, pp. 11–26.
13. Farooque A. A. Neurodegeneration in neuronal trauma, neurodegenerative diseases, and neuropsychiatric disorders. Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases. *Springer*, 2010, pp. 1–25.
14. Farooque A. A. Neurochemical aspects of neurodegenerative disease. Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases. *Springer*, 2010, pp. 249–324.
15. McDonald M. P., Dahl E. E., Overmier J. B., Mantyh P., Cleary J. Effects of exogenous β -amyloid peptide on retention for special learning. *Behav. Neural Biol.*, 1994, vol. 62, pp. 60–67.
16. Yamada K., Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, vol. 88, pp. 93–163.
17. Iqbal K., Bolognin S., Wang X., Basurto-Islas G., Blanchard J., Tung Y. C. Animal models of the sporadic form of Alzheimer's disease: focus on the disease and not just the lesions. *J. Alzheimers Dis.*, 2013, vol. 37, pp. 469–474.
18. Demetrius L. A., Magistretti P. J., Pellerin L. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the inverse Warburg test. *Front. Physiol.*, 2015, vol. 5, pp. 2–20.
19. Popugaeva E. A., Vlasova O. L., Bezprozvannyj I. B. The role of intracellular calcium in the development of Alzheimer's disease pathogenesis. *St. Peterburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics*, 2014, vol. 1, no. 189, pp. 79–90 (in Russian).
20. Stutzmann G. E. The pathogenesis of Alzheimers disease is it a lifelong «calciumopathy»? *Neuroscientist*, 2007, vol. 13, no. 5, pp. 546–559.
21. Bezprozvanny I., Mattson M. P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 2008. Vol. 31, no. 9, pp. 454–63.
22. Berridge M. J. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 1998, vol. 21, no. 1, pp. 13–26.
23. Chernyuk D. P., Vlasova O. L., Bezprozvannyj I. B., Popugaeva E. A. Reducing the number of amyloid plaques in the cerebral cortex of mice by hyperexpression of the protein STIM 2. *St. Peterburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics*, 2016, vol. 253, no. 4, pp. 139–149 (in Russian).
24. Bogachuk A. P., Storozheva Z. I., Telegin G. B., Chernov A. S., Proshin A. T., Sherstnev V. V., Zolotarev Yu. A., Lipkin V. M. Specific activity of amide form of HPDF-6 peptide: study on transgenic model of Alzheimer's disease. *Acta Naturae*, 2017, vol. 33, no. 3, pp. 68–74 (in Russian).
25. Hardy J., Selkoe D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, vol. 297, no. 5580, pp. 353–356.
26. Bergmans B. A., De Strooper B. γ -secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurol.*, 2010, vol. 9, no. 2, pp. 215–226.
27. Iptyshev A. M., Gorina Ya. V., Lopatina O. L., Komleva Yu. K., Salmina A. B. Experimental models of Alzheimer's disease: advantages and disadvantages. *Siberian Medical Review*, 2016, vol. 4, no. 100, pp. 5–21 (in Russian).
28. Cai Z., Qiao P-F, Wan C-Q, Cai M., Zhou N-K, Li Q. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.*, 2018, vol. 63, no. 4, pp. 1223–1234. DOI: 10.3233/JAD-180098
29. Burgess A., Dubey S., Yeung S., Hough O., Eterman N., Aubert I., Hynynen K. Alzheimer disease in a mouse model: MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior. *Radiology*, 2014, vol. 273, pp. 736–745.
30. Leinenga G., Götz J. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci. Transl. Med.*, 2015, vol. 7, no. 278ra33.



31. Jordão J. F., Thévenot E., Markham-Coultes K., Scarcelli T., Weng Y. Q., Xhima K., O'Reilly M., Huang Y., McLaurin J., Hynynen K., Aubert I. Amyloid- β plaque reduction, endogenous antibody delivery and glial activation by brain-targeted, transcranial focused ultrasound. *Exp. Neurol.*, 2013, vol. 248, pp. 16–29.
32. Sweeney M. D., Sagare A. P., Zlokovic B. V. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 2018, vol. 14, pp. 133–150.
33. Montagne A., Zhao Z., Zlokovic B. V. Alzheimer's disease: A matter of blood–brain barrier dysfunction? *J. of Exp. Med.*, 2017, vol. 214, no. 6, pp. 3151. DOI: 10.1084/jem.20171406
34. Haar M. J. van de, Jansen J. F., Jeukens C. R., Burgmans S., van Buchem M. A., Muller M., Hofman P. A. M., Verhey F. R. J., van Osch M. J. P., Backes W. H. Subtle blood-brain barrier leakage rate and spatial extent: Considerations for dynamic contrast-enhanced MRI. *Med. Phys.*, 2017, vol. 44, pp. 4112–4125.
35. Brundel M., Heringa S. M., de Bresser J., Koek H. L., Zwaneburg J. J., Kappelle L. J., Luijten P. R., Biessels G. J. High prevalence of cerebral microbleeds at 7Tesla MRI in patients with early Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2012, vol. 31, no. 2, pp. 259–263. DOI: 10.3233/JAD-2012-120364.
36. Heringa S. M., Sagare A. P., Zlokovic B. V., Koek H. L., Kappelle L. J., Biessels G. J. Utrecht Vascular Cognitive Impairment (VCI) Study Group. Multiple microbleeds are related to cerebral network disruptions in patients with early Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2014, vol. 38, no. 1, pp. 211–221. DOI: 10.3233/JAD-130542
37. Haar M. J. van de, Burgmans S., Jansen J. F., Van Osch M. J., Van Buchem M. A., Muller M., Hofman P. A. M., Verhey F. R. J., Backes W. H. Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology*, 2016, vol. 281, no. 2, pp. 527–535. DOI: 10.1148/radiol.2016152244
38. Haar M. J. van de, Jansen J. F., van Osch M. J., van Buchem M. A., Muller M., Wong S. M., Hofman P. A. M., Burgmans S., Verhey F. R. J., Backes W. H. Neurovascular unit impairment in early Alzheimer's disease measured with magnetic resonance imaging. *Neurobiol Aging.*, 2016, vol. 45, pp. 190–196. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.006
39. Salmina A. B., Inzhutova A. I., Malinovskaya N. A., Petrova M. M. Endothelial dysfunction and repair in Alzheimer's type of neurodegeneration: neuronal and glial control. *J. Alzheimer's Dis.*, 2010, vol. 22, no. 1, pp. 17–36.
40. Nelson A. R., Sweeney M. D., Sagare A. P., Zlokovic B. V. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1862, pp. 887–900.
41. Hellweg R., Gericke C. A., Jendroska K., Hartung H. D., Cervós-Navarro J. NGF content in the cerebral cortex of nondemented patients with amyloid plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1998, vol. 16, pp. 787–794.
42. Chiaretti A., Barone G., Riccardi R., Antonelli A., Pezzotti P., Genovese O., Tortorolo L., Conti G. NGF, DCX, and NSE upregulation correlates with severity and outcome of head trauma in children. *Neurology*, 2009, vol. 72, pp. 609–616.
43. Calissano P., Amadoro G., Matrone C., Ciafre, S., Marolda R., Corsetti V., Ciotti M. T., Mercanti D., Di Luzio A., Severini C., Provenzano C., Canu N. Does the term 'trophic' actually mean anti-amyloidogenic? The case of NGF. *Cell Death Differ.*, 2010, no. 17, pp. 1126–1133.
44. Calissano P., Matrone C., Amadoro G. Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins related to Alzheimer's disease. *Dev. Neurobiol.*, 2010, vol. 70, no. 5, pp. 372–382.
45. Winkler J., Thal L. J. Effects of nerve growth factor treatment on rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis produced by ibotenic acid, quisqualic acid, and AMPA. *Exp. Neurol.*, 1995, vol. 136, no. 2, pp. 234–250.
46. Smith D. E., Roberts J., Gage F. H., Tuszynski M. H. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, no. 19, pp. 10893–10898.
47. Povarnina P. Yu., Voroncova O. N., Gudasheva T. A., Ostrovskaya R. U., Seredenin S. B. The original peptide mimetics of nerve growth factor GK-2 restores impaired cognitive functions in rat models of Alzheimer's disease. *Actanaturae*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 88–95 (in Russian).
48. Colangelo A. M., Bianco M. R., Vitagliano L., Cavaliere C., Cirillo G., De Gioia L., Diana D., Colombo D., Redaelli C., Zaccaro L., Morelli G., Papa M., Sarmientos P., Alberghina L., Martegani E. A new nerve growth factor-mimetic peptide active on neuropathic pain in rats. *J. Neurosci.*, 2008, vol. 28, no. 11, pp. 2698–2709.
49. Obiany O., Ye K. Novel small molecule activators of the Trk family of receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, vol. 1834, pp. 2213–2218.
50. Skaper S.D. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol. Disord., DrugTargets*, 2008, vol. 7, pp. 46–62.
51. Scarpi D., Cirelli D., Matrone C., Castronovo G., Rosini P., Occhiato E. G., Romano F., Bartali L., Clemente A. M., Bottegoni G., Cavalli A., De Chiara G., Bonini P., Calissano P., Palamara A. T., Garaci E., Torcia M. G., Guarna A., Cozzolino F. Low molecular weight, non-peptidic agonists of TrkA receptor with NGF-mimetic activity. *Cell Death Dis.*, 2012, vol. 3, no. 7, pp. 339.

Cite this article as:

Zinchenko E. M., Klimova M. M., Shirokov A. A., Navolokin N. A., Martynov D. V., Antonova T. S., Blohina I. A., Agranovich I. M., Terskov A. V., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Changes in the Permeability of the Blood-Brain Barrier in the Development of Alzheimer's Disease in Mice. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 4, pp. 427–439 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-4-427-439>