

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт Биомедицинских Систем и Биотехнологий**

На правах рукописи

ЧЕРНЮК ДАРЬЯ ПАВЛОВНА

**Молекулярные механизмы, вовлеченные в развитие патологии болезни
Альцгеймера, и способы их коррекции.**

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 «Биофизика»

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы
(диссертации)

Автор работы: Чернюк Д.П.
Научный руководитель:
д.б.н., проф., Безпрозванный И.Б.

Санкт Петербург – 2022

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей школе биомедицинских систем и технологий Института биомедицинских систем и биотехнологий на базе научно-исследовательской лаборатории «Лаборатория Молекулярной Нейродегенерации» федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор ВШБСиТ: *– Власова Ольга Леонардовна –,
д.ф.-м.н., доц.*

Научный руководитель: *– Безprozванный Илья Борисович –,
д.б.н.*

Рецензент: *– Зайцев Алексей Васильевич –,
д.б.н.*

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «СанктПетербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте

Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Оглавление

Введение.....	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	6
Цели и задачи.....	11
Научная новизна.....	12
Теоретическая и практическая значимость работы.....	13
Методология и методы исследования.....	14
Личный вклад автора	15
Положения, выносимые на защиту	15
Достоверность результатов	16
Апробация результатов диссертационного исследования.....	16
Публикации.....	17
Структура и объем научного доклада	18
Литературный обзор.....	19
Глава 1. Болезнь Альцгеймера, молекулярные механизмы патогенеза	19
Глава 2. Bcl-2 в патогенезе БА.....	24
Глава 3. Водный Лабиринт Морриса, разработка программного обеспечения.	27
Материалы и методы исследования	30
1. Животные и материалы	30
2.Стереотаксическая операция.....	31
3.Иммунопреципитация.....	31
4.Морфология дендритных шипиков	33
5.Иммуногистохимия.....	33
6."Водный лабиринт Морриса".....	34
7.Разрабатываемое программное обеспечение	35
Результаты исследования	40
1. Minorontikos.....	40
2. Взаимодействие белков Bcl-2 и Bcl-2K17D с IP3R1 и RyR2.....	45

3. Анализ морфологии дендритных шипиков в гиппокампе мышей линии 5FAD после гиперэкспрессии белков Vcl-2.....	47
4. Анализ числа амилоидных бляшек в мозге 5FAD мышей после гиперэкспрессии белков Vcl-2.	49
5. Когнитивные функции 5FAD мышей после гиперэкспрессии белков Vcl-2.	52
Обсуждение результатов	54
Заключение.....	58
Список литературы	60

Введение

Актуальность темы исследования

Термином нейродегенеративные заболевания (НДЗ) определяется большая группа нейропатологий, развивающихся у лиц преимущественно зрелого возраста, для которых характерно прогрессирующая гибель определенных групп нервных клеток, сопровождающаяся атрофией соответствующих отделов головного мозга. Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, возникающим преимущественно у людей пожилого возраста. При БА в первую очередь поражаются клетки гиппокампа, области мозга, ответственной за формирование и хранение памяти. В связи с этим, основным проявлением данного заболевания является прогрессирующая потеря памяти, со временем приводящая к слабоумию и полной потере способности к самообслуживанию. В связи с ростом благосостояния населения и увеличению продолжительности жизни в развитых странах БА приобретает статус огромной социальной и экономической проблемы.

В настоящее время не достигнуто полного понимания причин возникновения и развития БА, поэтому современные методы терапии лишь несколько смягчают симптомы, но пока не позволяют ни остановить, ни замедлить развитие заболевания. Лекарства, которые сейчас используются для лечения БА, способны только облегчить симптомы. В основном это препараты, восполняющие дефицит нейротрансмиттеров - ингибиторы ацетилхолинэстеразы. На основании доминирующей «амилоидной гипотезы» было разработано несколько стратегий, направленных на поиск терапевтических агентов для лечения БА. Соответственно, основной мишенью при разработке лекарственной терапии являлся бета-амилоид. Согласно проведенным клиническим испытаниям с 2002 по 2012 год только один препарат было официально одобрен к применению для лечения БА, Мемантин, который является антагонистом NMDA рецепторов глутамата [1].

В то время как стратегии антиамилоидной терапии до сих пор не были успешными у пациентов [2], недавно разработанный Aducanumab, возможно, будет иметь большой успех [3], однако на данный момент его эффективность вызывает большие споры в научном сообществе. В связи с этим, все больше ученых сходятся во мнении, что необходимо более детальное изучение физиологической и патологической роли бета-амилоида, а также поиск новых сигнальных путей, вовлечённых в патогенез БА и новых объектов потенциального терапевтического воздействия помимо β амилоида.

Поведенческие тесты являются необходимой и обязательной стадией изучения нейродегенеративных заболеваний на уровне *in vivo*, так как только они могут выявить отклонение когнитивных функций у экспериментальных животных. При БА происходит нарушение функции памяти и процессов обучения, наиболее показательным для этих функций является поведенческий тест «Водный Лабиринт Морриса» (Morris Water Maze, MWM). Кроме самой процедуры проведения теста важным этапом является качественная и объективная обработка полученных с эксперимента данных. Поэтому разработка доступного и удобного программного обеспечения для автоматизации «Водного Лабиринта Морриса» является актуальной задачей современной нейробиологии, особенно для российского научного сообщества, так как на данный момент нет качественного отечественного ПО.

Степень разработанности темы исследования

Впервые о болезни Альцгеймера мир услышал 3 ноября 1906 года на 37-м съезде психиатров Юго-Западной Германии. Чуть позже в 1907 году вышла статья чешского психиатра и невропатолога Оскара Фишера, где описывается наличие бляшек и нейрофибриллярных клубков в 12 из 16 случаях старческого слабоумия [4]. В 1976 году Роберт Катцман вывел, что старческая форма БА является, примерно, четвертой или пятой в списке

причин смерти населения США, и предположил, что старческое слабоумие и болезнь Альцгеймера необходимо рассматривать как одно заболевание [5]. С развитием методов прижизненной визуализации головного мозга ученые получили более широкий спектр инструментов для исследования развития и причин возникновения болезни Альцгеймера. Так в 1980х годах были получены данные о раннем изменении гиппокампа у пациентов с БА [6-8]. Благодаря этим открытиям, было выявлено что гиппокамп - это ключевое место патологии БА. В 1990 году при помощи метода конфокальной микросъемки была обнаружена корреляция между когнитивными функциями пациентов с БА и количеством синаптических контактов во взятых у них биопсиях мозга - чем сильнее выражены когнитивные нарушения у пациентов, тем большая потеря синаптических контактов между нейрональными клетками у них наблюдается [9, 10]. Это открытие очень важно, так как именно оно позволило сделать вывод, что болезнь Альцгеймера - это не просто нейродегенеративное заболевание, при котором погибают нервные клетки головного мозга, а болезнь "синаптической потери". Это заключение дало толчок исследованиям развития БА в сторону изучения особенностей синаптических контактов, их образования и функционирования. В 1992 году нейробиолог Марк Маттсон показал, что в развитие БА вовлечен гомеостаз кальция [11]. Это открытие дало начало развитию самой молодой, но перспективной гипотезы патогенеза болезни Альцгеймера - кальциевой гипотезе. К 2010 году накопилось много исследований, согласно которым дисрегуляция баланса кальция сопровождает развитие БА. Поэтому в современной нейробиологии появилось предположение, что именно нарушение кальциевого сигналинга может быть первопричиной, которая приводит к каскаду молекулярных нарушений в головном мозге, включая образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков.

В 2009 году И. Б. Безprozванный предложил, что одну из важнейших ролей в патогенезе нейродегенеративных заболеваний играют изменения в

нейрональной Ca^{2+} сигнализации, которые также наблюдается при нормальном старении [12]. Нейрональный кальций является одним из важнейших вторичных посредников в нейронах, который принимает непосредственное участие в синаптической передаче.

Нейроны очень чувствительны к внутриклеточному Ca^{2+} гомеостазу, поэтому даже самые малые аномалии в Ca^{2+} сигнализации могут привести к разрушительным последствиям в течение длительного периода времени. Нарушение механизмов кальциевого сигналинга является одним из самых ранних изменений на молекулярном уровне в этиологии БА. Было показано, что мутации в PSEN (белки пресенилины), ассоциированные с наследственной формой БА опосредуют высвобождение кальция из ЭПР либо непосредственно [13, 14], либо путем модуляции кальциевых каналов ЭПР [15-17]. Одним из каналов, расположенных на мембране ЭПР, является инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор (IP3R). Его функциональная активность повышается вследствие мутаций в PSEN [16]. IP3R представляет собой внутриклеточный кальциевый канал, для которого существует три изоформы [18, 19]. Изоформа IP3R1 является изоформой, преимущественно экспрессирующейся в головном мозге. IP3R1-опосредованное высвобождение кальция регулируется несколькими посттрансляционными модификациями, и было идентифицировано более 100 различных белков-регуляторов данного процесса [20]. Из-за его повсеместной экспрессии, IP3R1-опосредованное высвобождение кальция участвует во многих клеточных процессах, таких как выживание клеток, апоптоз, аутофагия и многие другие [21-23]. Важной частью этих процессов является «квази-синаптическая» передача кальциевого сигнала из ЭПР в митохондрии посредством так называемых митохондриально-ассоциированных мембран ЭПР (МАМ), через IP3R на стороне ER и по потенциал-зависимому анионному каналу и митохондриальному кальциевому унипортеру на митохондриальной стороне [24]. Трансфер кальция в митохондрии необходим в особенности для поддержания механизмов синтеза АТФ и в

целом для нормального функционирования клеток [25, 26]. Как повышение, так и понижение IP3R-опосредованного трансфера кальция в митохондриях приводят к их дисфункции и индуцируют клеточную гибель [27].

Функциональная активность IP3R во многом определяется белками-регуляторами. В недавних исследованиях научная группа под руководством Г. Бултынка продемонстрировала, что IP3R является мишенью анти-апоптотических белков В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), включая Bcl-2 и Bcl-XL [28, 29]. Эти белки характеризуются четырьмя гомологичными доменами, причем четвертый (BH4) является ключевым для осуществления анти-апоптотической функции. Bcl-2/Bcl-XL посредством их гидрофобного кармана противодействует пермеабиллизации наружной митохондриальной мембраны путем скаффолдинга и нейтрализации про-апоптотических членов семейства Bcl-2, белков Bax и Bak, предотвращая их олигомеризацию и образование пор [30].

Научная группа Г. Бултынка и другие исследователи установили, что Bcl-2 связывается и ингибирует IP3R через его четвертый домен BH (BH4) [28, 29]. Кроме того, белки семейства Bcl-2 также ассоциированы с БА. Гиперэкспрессия белка Bcl-2 в головном мозге на модели трансгенных мышечей с БА замедляла прогрессирование когнитивных нарушений, в то время как образование внеклеточных бляшек уменьшалось [31]. Подводя итог вышеизложенному, можно заключить, что мутации в PSEN, ассоциированные с наследственной формой БА влияют на внутриклеточную передачу кальций-зависимых сигналов, которые опосредуют эти дефекты. В этом проекте мы впервые исследуем, может ли Bcl-2 и/или его домен BH4 нормализовать чрезмерное IP3R-опосредованное высвобождение кальция из ЭПР, вызванное мутациями в PSEN, ассоциированными с наследственной формой БА.

Правильное функционирование процессов обучения и памяти являются наиболее важными когнитивными функциями при изучении болезни Альцгеймера, так как именно потеря памяти и невозможность запоминания

новой информации считаются ключевыми факторами, сопровождающими БА. Как один из важнейших этапов исследования, поведенческие тесты являются единственной методологией, способной выявить когнитивные нарушения. Поэтому они также являются важным этапом проведения поиска и оценки эффективности потенциальных терапевтических стратегий и фармакологических агентов в нейробиологических, неврологических, психологических и психиатрических исследованиях [32-41]. Золотым стандартом для подобных исследований в рамках изучения патогенеза БА является «Водный Лабиринт Морриса» [35-37].

Из-за особенностей работы с биологическими объектами проведение поведенческих тестов является очень трудозатратной работой для ученого-исследователя. Преобладание визуального контроля проведения опыта, а также ручной обработки полученных данных приводит к субъективным, неточным и неполным результатам. Поэтому автоматизация поведенческого теста необходима в современных реалиях. Такая компьютеризированная система должна обеспечивать быстрое и точное отслеживание с вычислением в реальном времени определенных параметров. У современного ученого есть два очевидных способа получить доступ к автоматизированному анализу MWM: (I) Воспользоваться коммерческим программным обеспечением. Примерами таких коммерческих автоматизированных программ для анализа поведения у грызунов могут служить EthoVision [42], Smart Video Tracking Software (www.panlab.com), Video-Track (www.viewpoint.fr) и AnyMaze (www.stoeltingco.com). Значительный недостаток у них – очень высокая стоимость. Большинство коммерческих продуктов продаются в виде аппаратного и программного пакета, что делает их недоступными для многих лабораторий; (II) Можно воспользоваться общедоступными программами, разработанными и выложенными для безвозмездного пользования любого желающего, например, Tracking [43], MouVeAT [44] или Tox-Trac [45]. Плюсы такой программы – абсолютно простой и незатратный способ приобретения. А вот

к минусам можно отнести возможное низкое качество анализа, сложный для обычного пользователя интерфейс, избирательную специализацию и низкую апробацию таких программ. Также для некоторых общедоступных опций программного обеспечения требуется лицензия MATLAB [46], что приводит к увеличению стоимости, занимает намного больше времени или ограничено операционными системами.

Цели и задачи

Проверка гипотезы о том, что нормализация кальциевого выброса из ЭР через IP3R, осуществляемая через белок - регулятор апоптоза Bcl-2 (В-клеточной лимфомы-2), может оказывать благоприятное воздействие на некоторые ранние патологические аспекты функционирования клеток, наблюдаемые при развитии БА, является целью данного исследования. Для достижения цели сформулированы и решены следующие научные задачи:

1. Разработать доступный качественный отечественный программный продукт для осуществления исследования с использованием «Водного Лабиринта Морриса», апробировать его в лабораторных условиях и сравнить результаты с двумя из самых популярных коммерческих продуктов – VideoMot компании TSE Systems и EthoVision разработки Noldus
2. Подтвердить формирование белкового комплекса между белками Bcl-2 и каналами выброса кальция из эндоплазматического ретикула *in vivo* на мышинной модели БА.
3. Выяснить, влияет ли Bcl-2-опосредованная регуляция кальциевого выброса из эндоплазматического ретикула на морфологию синапсов.
4. Установить влияние Bcl-2-опосредованной регуляции кальциевого выброса из эндоплазматического ретикула на накопление амилоидных бляшек в мышинной модели БА.

5. Выявить воздействие Vcl-2 -опосредованной регуляции кальциевого выброса из эндоплазматического ретикулума в нейронах гиппокампа на когнитивные функции у мышей с патологией БА

Научная новизна

В рамках данного проекта впервые было рассмотрено в качестве терапевтической стратегии для лечения БА ингибирование IP3R -опосредованного чрезмерного выброса кальция из эндоплазматического ретикулума, вызываемого мутациями при наследственной форме БА. Для оценки нейропротекторных свойств в рамках данной терапевтической стратегии оценивались ранние признаки БА, которые, в свою очередь, могут влиять на более поздние аспекты течения заболевания. Интересным преимуществом использования Vcl-2 в качестве ингибитора IP3R -опосредованного высвобождения кальция является анти-апоптотические свойства белка Vcl-2 в качестве ингибитора про-апоптотических белков BAX и BAK , которые в значительной степени не зависят от функциональной активности IP3R .

Таким образом, Vcl-2 может играть двойную роль, выступая, во-первых, в качестве ингибитора IP3R -опосредованного высвобождения кальция, и во-вторых, в качестве ингибитора BAX/BAK -опосредованного апоптоза в клетках при развитии БА.

Таким образом, это первое исследование, посвященное способности Vcl-2 ингибировать избыточную передачу кальциевых сигналов, опосредованную IP3R , наблюдаемую при патогенезе БА.

Кроме того, при реализации одной из поставленных задач разработан абсолютно новый программный продукт, *Minoronticos*, который отвечает всем современным потребностям ученых-исследователей при использовании поведенческого теста «Водный Лабиринт Морриса». Данный продукт по интерфейсу и функциональности ничем не уступает зарубежным дорогостоящим коммерческим ПО.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в данной работе о молекулярных механизмах нейрональных клеток, обладают высокой научной значимостью для понимания фундаментальных вопросов современной нейробиологии, таких как исследование кальциевой регуляции, стабильности синаптических контактов, механизмов формирования памяти и нарушений, наблюдаемых при болезни Альцгеймера. Полученные данные свидетельствуют о том, что нарушения гомеостаза кальция могут являться первопричиной развития симптомов БА. Практическая значимость результатов исследования заключается в обнаружении возможной мишени для развития терапевтических подходов для лечения и/или замедления развития БА. Рассмотрен новый молекулярный путь, который может также стать ключевым в разработке терапии БА. Данные работы дают основание предположить, что сверхэкспрессия Vcl-2 имеет множественные нейропротекторные эффекты в моделях БА, которые могут выходить далеко за рамки его канонических анти-апоптотических эффектов, и воздействуя на внутриклеточные каналы высвобождения Ca^{2+} , ВН4 домен Vcl-2 может ингибировать избыточное IP3R/RyR-опосредованное высвобождение кальция из ЭР. Эти результаты позволяют предположить, что анти-апоптотические домены Vcl-2 и производные белковые домены, такие как домен ВН4, могут иметь терапевтический потенциал для предотвращения начала БА и задержки нейродегенерации. Кроме того, значимость результатов работы выходит за рамки понимания механизмов патологии болезни Альцгеймера, обнаруженный молекулярный путь имеет важное значение для других нейродегенеративных заболеваний, в который происходит нарушение кальциевого гомеостаза, для понимания общих процессов старения и вопросов формирования памяти и работы сигнальных механизмов нейрональных клеток.

Важное практическое значение имеет разработанный в данном исследовании программный продукт Minorontikos. Программа позволяет быстро и качественно обрабатывать данные эксперимента «Водный Лабиринт Морриса», выдавая такие параметры как латентное время поиска, время и процентное время в квадрантах интереса, длина пройденного пути, ошибка углового направления, средняя близость к платформе (или Близость Галлахера, индекс обучения), число пересечений зоны интереса. Кроме того, одним из выходных файлов является сводная таблица параметров X-Y-t, где X и Y – это координаты местоположения испытуемого животного, t – время, поэтому при необходимости все дополнительные функции положения-времени (а все параметры трассировки объекта являются данными функциями) пользователь может вывести или проверить самостоятельно. Разработанное программное обеспечение Minorontikos имеет вид полноценной автономной и самостоятельной программы, не требующей установки дополнительного ПО или плагинов. Это обеспечивает ее свободное использование другими исследователями по всему миру.

Методология и методы исследования

Для выполнения поставленных в данном исследовании задач применялись следующие методы: билатеральная стереотаксическая операция с использованием аденоассоциированных вирусов (инжектирование), иммунопреципитация, Вестерн-Блот анализ, иммуногистохимическое окрашивание и HCl-метод поиска антигена, транскраниальная перфузия, конфокальная микроскопия и отработанный протокол проведения «Водного Лабинта Морриса». Для разработки программного продукта были использованы языки программирования Rust и C++.

Личный вклад автора

Основные результаты данного исследования получены лично автором с использованием экспериментальной базы Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации Санкт-Петербургского государственного политехнического университета Петра Великого. Планирование экспериментов и обсуждение полученных результатов проводилось совместно с научным руководителем д.б.н. И.Б. Безпрозванным. Разработка технического задания для ПО для автоматизации поведенческого теста «Водный Лабиринт Морриса» осуществлялось совместно с сотрудниками лаборатории Промышленных систем 8 потоковой обработки данных Санкт-Петербургского государственного политехнического университета Петра Великого Зориным Арсением Геннадьевичем и Болсуновской Мариной Владимировной. Написание программного кода Minorontikos было выполнено Зориным Арсением Геннадьевичем. Обработка, статистический анализ и подготовка результатов к публикациям проводилась лично автором, тексты публикаций подготавливались совместно с соавторами

Положения, выносимые на защиту

1. Интерфейс и функционал программы Minorontikos, разработанной строго для анализ поведенческого теста «Водный Лабиринт Морриса», не уступает популярным коммерческим продуктам.
2. Белок RyR взаимодействует с белками Vcl-2 дикого типа и его мутантной формы Vcl-2K17D, IP3R1 взаимодействует с Vcl-2 дикого типа, а сродство между IP3R и мутантной формой Vcl-2K17D значительно снижено.
3. Гиперэкспрессия нативной формы Vcl-2 в CA1 области гиппокампа на ранних стадиях способствует предотвращению синаптотоксического эффекта у мышей трансгенной линии 5FAD в более зрелом возрасте.

4. Гиперэкспрессия мутантной формы Vcl-2K17D обладает амилоид-протекторными свойствами и улучшает когнитивные функции 5FAD мышей, в отличие от его нативной формы.

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается их согласованностью, использованием комплекса современных взаимодополняющих нейробиологических методов исследования, анализа и статистической обработки полученных результатов при помощи t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна — Уитни, однофакторного дисперсионного анализа и критерия Краскела — Уоллиса, а также сравнение полученных данных с имеющимися на данный момент литературными источниками.

Апробация результатов диссертационного исследования

На разработанное в диссертационном исследовании программное обеспечение получено Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2020619187 «Программа автоматизации исследования прохождения водного Лабиринта Морриса» от 13 августа 2020 года (авторы Зорин А.Г., Болсуновская М.В., Чернюк Д.П., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б.). Результаты исследования докладывались: на XVI Всероссийской конференции с международным участием «СОВЕЩАНИЕ ПО ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ имени академика Л.А. Орбели» 19-22 октября 2020 года, Санкт-Петербург, Россия; на конференции с международным участием «Эколого-биологическое благополучие флоры и фауны» (EBWFF-2020) 23-24 сентября 2020 года, Благовещенск, Россия; на конференции Российского Нейрохимического Общества «RUSNEUROCHEM» 22-24 мая 2022 года, Санкт-Петербург.

Публикации

1. Elena Popugaeva, Daria Chernyuk and Ilya Bezprozvanny. Reversal of Calcium Dysregulation as Potential Approach for Treating Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 2020, 17, 344-354. DOI: 10.2174/1567205017666200528162046

2. Д. П. Чернюк, А. Г. Зорин, К. З. Деревцова, Е. В. Ефимова, В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, О. Л. Власова, М. В. Болсуновская, И. Б. Безprozванный. Автоматический анализ данных поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*, 2021, Т. 71, № 1, стр. 126-135. DOI: 10.31857/S0044467721010044

D.P. Chernyuk, A.G. Zorin, K.Z. Derevtsova, E.V. Efimova, V.A. Prikhodko, Y.I. Sysoev, O.L. Vlasova, M.V. Bolsunovskaia, and I.B. Bezprozvanny. Automatic analysis of the “Morris Water Maze” behavioral test data. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*, 2021, 71(1), 126-135. DOI: 10.31857/S0044467721010044

3. Д.П. Чернюк, А.В. Большакова, О.Л. Власова, И.Б. Безprozванный. Возможности и перспективы поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». *Российский физиологическом журнале им. И.М. Сеченова*, 2021, том 107, № 3, с. 267–287

D.P. Chernyuk, A.V. Bol'shakova, O.L. Vlasova, I.B. Bezprozvanny. Opportunities and prospects of the behavioral test “Morris Water Maze”. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2021, Volume 57, pp 289-303; <https://doi.org/10.1134/s0022093021020113>

4. Zorin A., Chernyuk D., Vlasova O., Bolsunovskaya M., Bezprozvanny I. Software for analyzing the behavioural test "morris Water Maze". *E3S Web Conf.*, 203 (2020) 01029. DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202020301029>

5. Чернюк Д. П., Зорин А.Г., Безprozванный И.Б. (2020) Автоматизация анализа поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». *Журнал*

Эволюционной Биохимии и Физиологии, том 56, № 7, 745-746 с. DOI: 10.31857/S004445292007164X

D. P. Chernyuk, A. G. Zorin, I. B. Bezprozvanny. (2020) Automation of the behavioral test “Morris Water Maze”. Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii, Vol.56 (7),pp. 745-746. DOI: 10.31857/S004445292007164X

Структура и объем научного доклада

Доклад состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания полученных результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Текст научного доклада изложен на 66 страницах, содержит 1 таблицу, иллюстрирован 11 рисунками. Список литературы содержит 95 источников.

Литературный обзор

Глава 1. Болезнь Альцгеймера, молекулярные механизмы патогенеза

Современная наука хорошо знает, что из себя представляет структура головного мозга человека, но многие аспекты его функционирования остаются неизученными. Так многие нейродегенеративные заболевания, при которых гибнут нервные клетки мозга, до сих пор считаются неизлечимыми - механизм их развития остается не понятен. Одно из таких заболеваний - болезнь Альцгеймера (БА) - стала одной из самых частых причин развития деменции, потери памяти. "Alzheimer's Association" прогнозирует, что число больных растёт в геометрической прогрессии, и к 2050 году составит около 115 миллионов [1]. БА чаще всего является приобретенным ненаследственным заболеванием (спорадическая БА, СБА), но встречаются редкие случаи, когда патологические изменения в мозге вызываются определёнными мутациями (наследственная БА, НБА). Эти мутации бывают двух видов - в генах, кодирующих пресенилины (PSEN1 и PSEN2), и в гене, кодирующем амилоидный белок-предшественник (APP мутации). По одной из гипотез патогенеза БА (амилоидной) причиной заболевания может служить продуцируемый в нейронах токсичный бета-амилоид A β 42, который формирует амилоидные бляшки. После того, как было выявлено, что в присутствии A β -пептидов происходит дисрегуляция гомеостаза кальция, появились исследования влияния нарушенного кальциевого сигналинга в нейронах на развитие болезни Альцгеймера. К 2010 году накопилось много исследований, согласно которым дисрегуляция баланса кальция сопровождает развитие БА. Поэтому в современной нейробиологии появилось предположение, что именно нарушение кальциевого сигналинга может быть первопричиной, которая приводит к каскаду молекулярных нарушений в головном мозге, включая образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Как выяснилось последними исследованиями

[47-50], обе эти гипотезы частично правы: и токсичность амилоидных бляшек, и нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах наблюдаются у больных, страдающих БА. Более того, эти симптомы обнаружены и у здоровых людей при обычном старении [12]. Ещё в конце XX века было установлено, что болезнь Альцгеймера - это заболевание "синаптической потери". Нейрональный кальций является одним из важнейших вторичных посредников в нейронах, который принимает непосредственное участие в синаптической передаче.

Изначально синаптическую потерю относили к следствиям амилоидной токсичности, так как А β -олигомеры могут формировать в мембране нейрона поры, через которые кальций способен проникать в клетку. Взаимодействие А β с фосфатидилсеринем (PtdS - phosphatidylserine), находящемся в большом количестве на мембране клеток при митохондриальных нарушениях, которые возникают при старении, увеличивает способность А β соединяться с мембраной [12] (Рисунок 1). Доказано, что в нейронах, где снижен уровень цитоплазматического АТФ и увеличен уровень поверхностного PtdS, увеличена уязвимость к А β -токсичности, что ведет к притоку кальция в клетку и, в конечном итоге вызывает её смерть.

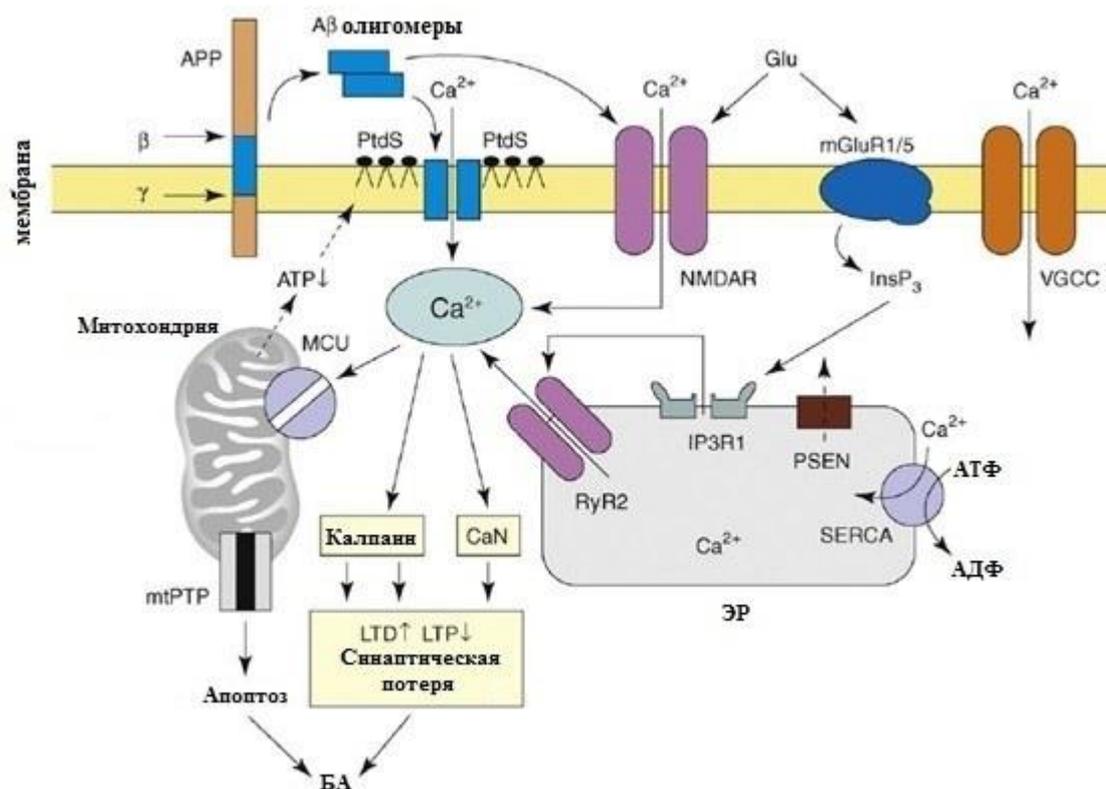


Рисунок 1. Ca²⁺ сигнализация в нейронах при БА. Адаптировано из [12].

Aβ олигомеры могут на прямую влиять на активность NMDA-рецепторов (чувствительных к N-метил-D-аспартату), AMPA-рецепторов (ионотропные рецепторы глутамата – рецепторы α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) и потенциалзависимых кальциевых каналов (VGCCs - voltage-gated calcium channels), что приводит к увеличению притока кальция в клетку. Повышенный уровень внутриклеточного кальция приводит к активации кальциейрина (CaN - calcineurin), Ca²⁺-активированной фосфатазы, которая влияет на синаптическую пластичность, и калпаина, что приводит к активации долговременной депрессии, ингибированию долговременной потенциации, модификации цитоскелета нейронов и синаптической потере. Кальций также поступает в митохондрии через митохондриальный Ca²⁺ унипорт (MCU - mitochondrial Ca²⁺ uniporter), что в конечном итоге приводит к активации митохондриальных пор с повышенной проницаемостью для кальция (mtPTP - mitochondrial permeability-transition pore), а также к апоптозу.

Из внутриклеточного пространства кальций попадает в эндоплазматический ретикулум (ЭР) через саркоплазматический и эндоплазматический ретикулярный Ca^{2+} -АТФазный насос (SERCA pump-sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPase pump). Из ЭР Ca^{2+} выходит через инозитол-1,4,5-трифосфат-зависимые рецепторы 1 типа (IP3R1) и Ca^{2+} -зависимые рианодиновые рецепторы 2 типа (RyR2). Так же и пресенилины (PS) играют роль каналов утечки Ca^{2+} из ЭР. Мутации пресенилинов при НБА нарушают эту функцию и приводят к переполнению ЭР кальцием.

Митохондрии играют особую роль в нейронах, выступая не только как основной источник АТФ, необходимый для поддержания электрохимических градиентов и возбудимости мембран, а также обеспечивают дополнительную буферную способность Ca^{2+} и участвуют во многих Ca^{2+} -опосредованных сигнальных процессах [51]. Непосредственная близость органелл и депо Ca^{2+} позволяет осуществлять прямую связь через сайты мембранных контактов [52]. Как правило, места контакта с мембраной обогащены шаперонами, которые стабилизируют плотное прилегание двух липидных бислоев [53]. Места контакта мембран между ЭР и митохондриями называются митохондриально-ассоциированными мембранами ЭР (МАМ). МАМ представляют собой динамические структуры, обеспечивающие взаимодействие между ЭР и митохондриями и необходимы для поддержания биоэнергетического баланса в клетках. Было продемонстрировано, что потенциалзависимый анионный канал 1 типа (VDAC1) на внешней митохондриальной мембране физически связан с IP3R через белок 75, регулируемый глюкозой (GRP75), что облегчает передачу опосредованных IP3R сигналов кальция к митохондрии и обеспечивая «квасисинаптический» поток кальция из ЭР в митохондрии [54]. Присутствие и функция IP3R в МАМ поддерживаются вспомогательными белками, такими как IRE1 α [55] и транслоказой внешней мембраны 70 (TOM70) [56], тем самым поддерживая правильный митохондриальный

метаболизм. Недавний обзор Loncke et al. дополнительно иллюстрирует влияние и функции IP3R на МАМ [57]. Нарушение функции IP3R ограничивает биоэнергетику митохондрий, тем самым увеличивая соотношение АМФ/АТФ. Это активирует АМФ-активируемую протеинкиназу и впоследствии инициирует аутофагию [58].

Ключевым аспектом передачи сигналов Ca^{2+} в нейронах является его участие в механизмах синаптической передачи и синаптической пластичности. Долговременная потенция (LTP) и долговременная депрессия (LTD) представляют собой облегчение или ослабление синаптической передачи между двумя нейронами, сохраняющееся в течение длительного времени после прекращения действия стимула, и считаются клеточными механизмами обучения и формирования памяти. Как LTP, так и LTD запускают сложные постсинаптические сигнальные кальциевые пути, обеспечивающие постоянные изменения синаптической силы. Как правило, LTP требует начального фосфорилирования и последующего аутофосфорилирования Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII), в то время как кальциеврин инициирует события дефосфорилирования, которые часто приводят к LTD [59]. Длительные изменения синаптической активности требуют транскрипционных ответов, которые также управляются сигналами Ca^{2+} и специфически распространяются в ядро, чтобы поддерживать синтез белков, участвующих в нейропластичности. Наиболее изученным Ca^{2+} -зависимым фактором транскрипции является цАМФ-чувствительный элемент-связывающий белок (CREB), опосредующий преобразование кратковременной памяти в долговременную. Массивный приток Ca^{2+} через рецептор N-метил-D-аспартата (NMDAR) во время LTP индуцирует активацию Ca^{2+} -зависимых киназ, таких как CaMKII, и впоследствии вызывает фосфорилирование CREB, что, в свою очередь, необходимо для индуцирования Ca^{2+} -зависимой транскрипции генов [60]. Другой фактор транскрипции, называемый ядерным фактором активированных T-клеток (NFAT), также регулируется

Ca^{2+} и кальциневрином в нейронах. Белки NFAT фосфорилированы и находятся в цитоплазме покоящихся клеток. При стимуляции они дефосфорилируются кальциневрином, транслоцируются в ядро и становятся транскрипционно активными, таким образом обеспечивая прямую связь между внутриклеточной передачей сигналов Ca^{2+} и экспрессией генов в нейронах [61].

Механизмы Ca^{2+} -регуляции особенно важны в синапсах, где протекают процессы синаптической передачи и синаптической пластичности. Постсинаптические структуры возбуждающих синапсов, называемые дендритными шипиками, обеспечивают компартиментализацию сигналов Ca^{2+} к локальным микродоменам. Морфология шипиков тесно связана с синаптической передачей и сильно коррелирует с текущей активностью нейронов. Структура и функция шипиков регулируются Ca^{2+} -активируемыми белками, такими как CAMKII и кальцинеурин. Недавние исследования также подчеркивают важность внутриклеточных запасов кальция в формировании и поддержании дендритных шипиков. Хотя дендритные шипики содержат внутренние хранилища Ca^{2+} и несколько кальциевых каналов, расположенных на плазматической мембране, включая AMPAR, NMDAR и VGCC, они используют менее мощные механизмы выхода Ca^{2+} и имеют более низкую эндогенную Ca^{2+} -буферную емкость по сравнению с сомой и дендритами [62].

Нейроны очень чувствительны к внутриклеточному Ca^{2+} гомеостазу, поэтому даже самые малые аномалии в кальциевой сигнализации могут привести к разрушительным последствиям в течение длительного периода времени.

Глава 2. Bcl-2 в патогенезе БА

Члены семейства белков В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2) критически контролируют процессы гибели и выживания клеток, регулируя

пермеабиллизацию наружной мембраны митохондрий (МОМР) [63-65]. Первая связь между Bcl-2 и внутриклеточным Ca^{2+} была описана в 1993 г. [66]. Позже многочисленные исследования выявили глубокое влияние белков семейства Bcl-2 на внутриклеточную передачу сигналов Ca^{2+} [67-69]. В том числе важна роль Bcl-2 в опосредовании передачи кальциевых сигналов в митохондриях и ЭР

Функциональная активность IP3R во многом определяется белками-регуляторами. В недавних исследованиях научная группа под руководством Г. Бултынка продемонстрировала, что IP3R является мишенью для белков семейства Bcl-2, включая Bcl-2 и Bcl-XL [28, 29, 70]. Эти белки характеризуются четырьмя гомологичными доменами, причем четвертый (BH4) является ключевым для осуществления анти-апоптотической функции. Bcl-2/Bcl-XL посредством их гидрофобного кармана противодействует пермеабиллизации наружной митохондриальной мембраны путем скаффолдинга и нейтрализации про-апоптотических членов семейства Bcl-2, белков Bax и Bak, предотвращая их олигомеризацию и образование пор [30].

Научная группа Г. Бултынка и другие исследователи установили, что Bcl-2 связывается и ингибирует IP3R через его четвертый домен BH (BH4) [28, 29] (Рисунок 2).

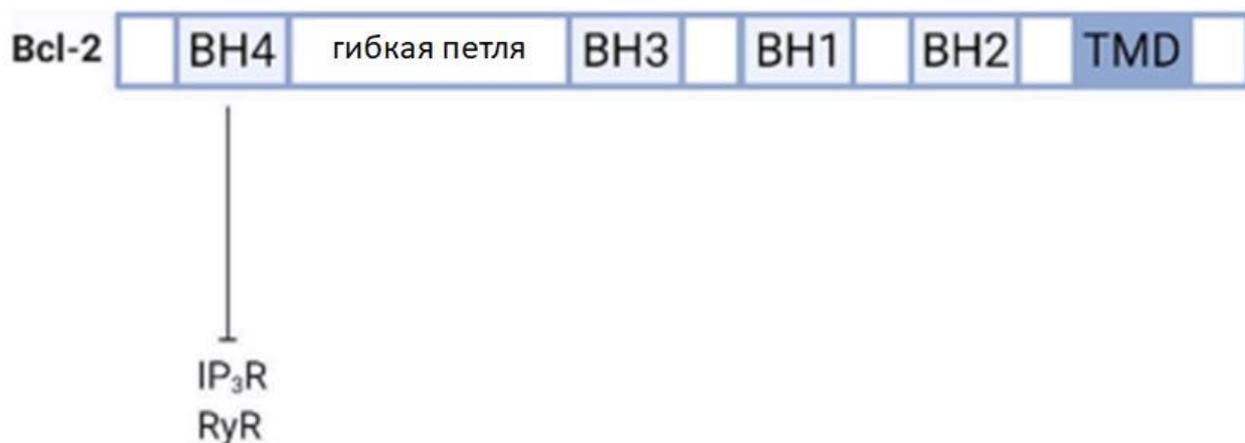


Рисунок 2. Схематический обзор линейного представления семейства белков Bcl-2. Bcl-2 содержит четыре гомологичных домена (BH). Известно, что домен BH4 связывает и ингибирует инозитол-1,4,5-трифосфатный

рецептор (IP3R), а также риадиноновый рецептор (RyR). Рисунок адаптирован из [70].

Участок аминокислот в центральном домене RyR имеет сильное сходство с сайтом связывания Bcl-2 в центральном домене IP3R. Bcl-2 через свой домен BH4 может связываться с центральным доменом канала RyR, тем самым подавляя высвобождение Ca^{2+} через RyR [71].

Экспрессия членов семейства белков Bcl-2 изменяется при БА [72]. Изменения в Bcl-2 при здоровом старении мозга отличаются от наблюдаемых в мозге моделей БА [73]. Иммунореактивность Bcl-2 в нейронах пациентов с БА с подтвержденной нейрофибриллярной дегенерацией снижена, что указывает на подавление Bcl-2 в этих дегенерирующих нейронах [74, 75].

Подавлению Bcl-2, наблюдаемому при БА, могут способствовать несколько механизмов. Например, считается, что отложения $A\beta$ способны регулировать экспрессию определенных микроРНК (miRNAs), которые могут влиять на гибель нейронов, наблюдаемую в животных моделях БА [76, 77]. Интересно, что miR-16-5p, микроРНК, которая нацеливается на мРНК Bcl-2 и, таким образом, снижает уровень белка Bcl-2, активируется в нейронах мышечной модели НБА, окружающих $A\beta$ -агрегаты, тем самым способствуя апоптозу в пораженных нейронах. [78, 79] Bhatnagar и др. показали повышенные уровни miR-34a и miR-34c в образцах крови пациентов с БА. Эти микроРНК подавляют четыре ключевых гена-мишени, одной из которых является Bcl-2, что приводит к значительному снижению количества Bcl-2 в образцах плазмы. Таким образом, это указывает на то, что Bcl-2 является потенциальным биомаркером нейродегенерации.

Другой возможный механизм, представляет собой интерференцию активных форм кислорода (ROS). У пациентов с БА повышен уровень ROS, что впоследствии вызывает снижение уровня Bcl-2 [80, 81]. Также это может быть связано с нарушением регуляции Ca^{2+} при БА. Наконец, предполагается, что ядерный фактор, связанный с эритроидом 2 (Nrf2),

который поддерживает уровень окислительно-восстановительного буфера глутатиона, играет важную роль в профилактике БА [82]. Интересно, что Nrf2 регулирует уровни Bcl-2, и в мозге пациентов с БА, помимо подавления Bcl-2, уровень Nrf2 также значительно снижен.

Кроме того, гиперэкспрессия белка Bcl-2 в головном мозге на модели трансгенных мышей с БА замедляла прогрессирование когнитивных нарушений, в то время как образование внеклеточных бляшек уменьшалось. Было выдвинуто предположение, что нейропротекторный эффект Bcl-2 связан с ингибированием активности каспазы 9 и каспазы 3 [31]. Однако вопрос о вовлечении механизмов кальциевой сигнализации в наблюдаемый эффект оставался открытым и актуальным. Следовательно, Bcl-2 может играть двойную роль выступая, во-первых, в качестве ингибитора высвобождения кальция, и во-вторых, в качестве ингибитора опосредованного апоптоза в клетках при развитии БА.

Резюмируя, вышеизложенное, мутации, ассоциированные с наследственной формой БА, влияют на внутриклеточный кальциевый сигналинг, в том числе приводя к чрезмерному высвобождению кальция из ЭР, а белок Bcl-2 может участвовать в данном сигнальном пути через взаимодействие с каналами выхода кальция из ЭР. Данное исследование направлено на выявление роли белка Bcl-2 в передаче кальций-зависимых сигналов, нарушенных при наследственной форме БА.

Глава 3. Водный Лабиринт Морриса, разработка программного обеспечения.

«Водный Лабиринта Морриса» (Morris Water Maze, MWM) является одним из самых популярных поведенческих тестов для изучения процессов формирования и консолидации памяти. Создателем теста считается британский нейробиолог Ричард Грэм Майкл Моррис [83, 84]. Идея MWM следующая - животных помещают в большой круговой бассейн с водой, и им необходимо выбраться из воды на скрытую платформу. Подопытным

животным необходимо, используя память, определить местоположение объекта, который они никогда не видели, не чувляли и не могли услышать. В этом и заключалась историческая новизна данного метода - пройти MWM тест возможно только с использованием пространственной памяти. Также по сравнению с тестами в сухих лабиринтах, «Водный Лабиринта Морриса» обладает большей эффективностью и пропускной способностью [85]. Благодаря своим особенностям он признан золотым стандартом для изучения процессов обучения и пространственной памяти [86] и часто используется в качестве общего анализа когнитивной функции при различных заболеваниях и воздействиях [32-41], в том числе является незаменимой методикой для изучения когнитивных нарушений при БА.

В век цифровых технологий визуальная регистрация считается необъективной и неточной методикой изучения поведения, поэтому широкое распространение получил автоматический анализ траектории движения животного [42, 87, 88]. Значительным плюсом автоматизации видеонаблюдения и анализа является надежность и последовательность алгоритма, чего сложно достичь при визуальной и ручной обработке данных. На данный момент на российском рынке не существует надежно работающего программного продукта для анализа поведения лабораторных грызунов в MWM, а предлагаемое ПО зарубежных разработчиков отличается высокой ценой.

Поэтому кроме самого проведения поведенческого теста «Водный Лабиринт Морриса» в рамках изучения роли Vcl-2 в кальциевой сигнализации при патологии БА, была поставлена ещё одна задача - разработать доступный качественный отечественный программный продукт для автоматизации тестирования «Водного Лабиринта Морриса», апробировать его в лабораторных условиях и сравнить результаты с двумя из самых популярных коммерческих продуктов – VideoMot компании TSE Systems и EthoVision разработки Noldus. Разработанное ПО должно быть

написано на языках программирования C++ и Rust, являться автономным инструментом с открытым исходным кодом, простым в установке и не требовать дополнительного программного обеспечения.

Материалы и методы исследования

Для исследования нейропротекторных свойств Vcl-2 в рамках выполнения проекта использовался широкий спектр современных методов биофизики и нейробиологии.

1. Животные и материалы

Для исследования БА использовались мыши линии 5FAD (B6SJLF1/J background, Jackson Labs: stock #006554). 5FAD - это линия трансгенных мышей с 5 мутациями - три мутации человеческого APP белка (Swedish (K670N/M671L), Florida (I716V), London (V717I)) и две мутации в белке пресенилине 1 (M146L, L286V). У мышей данной линии наблюдается гибель нейронов начиная с 6-месячного возраста, что коррелирует с накоплением бета амилоида и активацией каспазы 3 в крупных пирамидальных нейронах головного мозга [26]. Также было произведено скрещивание и бридинг двух мышиных линий – 5FAD и M-line. Мыши M-line (hy1-GFP-M) удобны для морфологического анализа нейрональных клеток, так как имеют GFP-флуоресцентно меченые нейроны, позволяющие подробно изучить морфологию клеток.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и в соответствии с европейскими нормативами по работе с лабораторными животными – директива 2010/63/EU Европейского парламента (directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010) и с соблюдением “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Мыши содержались в виварии Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого с 12-часовым световым циклом при свободном доступе к еде и воде.

Для гиперэкспрессии белков Vcl-2 в CA1 область гиппокампа использовались аденоассоциированные вирусы под контролем промотора нейронального белка синапсина: контрольный AAV2/7-mCherry (далее Control), AAV2/7-3xFLAG-Vcl-2-P2A-mCherry (далее Vcl-2), кодирующий нативный белок Vcl-2, и AAV2/7-3xFLAG-Vcl-2K17D-P2A-mCherry (далее Vcl-2K17D), кодирующий мутантную форму белка Vcl-2. В предыдущих исследованиях было показано, что мутация K17D нарушает ассоциацию домена VH4 Vcl2 с IP3R1 [29, 89].

2.Стереотаксическая операция

Двусторонняя стереотаксическая операция была применена для доставки аденоассоциированных вирусов с целью гиперэкспрессии белка Vcl-2 и его мутантной формы Vcl-2K17D в гиппокамп взрослых мышей по координатам для инъектирования в область CA1 гиппокампа: AP=-2.1, ML =+2.0 DV=-1.9. По прошествии 30-60 дней, когда целевые белки нарабатывались в достаточном количестве, проводились дальнейшие необходимые эксперименты.

3.Иммунопреципитация

Для установления взаимодействия Vcl-2, конъюгированного с Flag тагом, и двух белков IP3R1 и RyR2 использовался метод иммунопреципитации. Для иммунопреципитации через 30 дней после билатерального инъектирования происходила перфузия раствором фосфатно-солевого буфера (PBS), гиппокамп измельчался и переносился в гомогенизатор для лизиса клеток в лизирующем буфере, содержащем 25 мМ трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), 150 мМ хлорид натрия, 10 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту, 1% NP40 и раствор ингибитора протеаз в концентрации 1 мг/мл (Roche), pH 7,6 при температуре +4°C. Клетки лизировались в течение 5 часов, после чего производилось центрифугирование при 20 000 g при температуре +4°C в течение 20 минут. В это время предварительно отмытые холодным раствором PBS магнитные

частицы, конъюгированные с G-белком, инкубировались в течение 2,5 часов при температуре +4 °С с моноклональными антителами к Flag-тагу (разведение 1:100, Sigma Aldrich, Кат. № F1804) или с контрольными антителами. В качестве контрольных антител использовались иммуноглобулины животного-производителя аналогичного иммуноглобулинам антител для детектирования неспецифического связывания белков. После центрифугирования надосадочная жидкость, содержащая целевые белки, переносилась к антителам, осажденным на магнитных микрогранулах, и далее инкубировалась в течение 16 часов при +4°С с постоянным вращением проб на ротаторе. По окончании времени инкубации магнитные частицы с антителами и белковым комплексом отделялись от остальной части клеточного лизата при помощи миниатюрного магнитного штатива. Далее производилась серия отмывок лизирующим буфером для удаления неспецифически связавшихся белков. После чего белковый комплекс элюировался с магнитными частицами для дальнейшего анализа путем инкубации в 1-х кратном буфере Лэммли при +90°С в течение 5 минут. Проба, содержащая целевые белки в буфере Лэммли отделялась от магнитных частиц при помощи миниатюрного магнитного штатива и далее анализировалась при помощи Вестерн-Блот анализа. Клеточные лизаты разделяли в 3-8% полиакриламидном градиентном геле в денатурирующих условиях, переносили на мембрану и инкубировали с первичными антителами к IP3R1 (разведение 1:1000, Abcam, Кат. №ab264281), к RyR2 (разведение 1:500, DSHB, Кат. №34C-c) и к Vcl-2 (разведение 1:200, Invitrogen, Кат. №MA5-11757) в течение 16 часов. Мембрану несколько раз отмывали буфером, содержащим 20 мМ Трис, 150 мМ хлорид натрия и 0,1% полисорбат 20, pH 7,6 и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:200, кат. № P0448 «ДАКО», США) в течение 1 часа. Далее мембрану несколько раз отмывали от вторичных антител и инкубировали в растворе, индуцирующем реакцию хемиллюминесценции. После чего регистрировали сигнал при помощи

рентгеновской пленки. В качестве контроля нагрузки белка в пробе использовался уровень экспрессии Vcl-2.

4.Морфология дендритных шипиков

Для оценки морфологии дендритных шипиков *in vivo* была использована линия 5FAD-M трансгенных мышей, полученных путем скрещивания 5FAD мышей с трансгенными M-line мышами. Через 60 дней после инъектирования проводилась перфузия 4% раствором параформальдегида, разведенного в PBS. Фиксированные срезы головного мозга толщиной 30 мкм заключали под покровные стекла с использованием монтирующей среды Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc., США), после чего проводили морфологический анализ вторичных дендритов нейронов CA1 области гиппокампа при помощи конфокальной микроскопии. Количественный анализ распределения дендритных шипов по морфологическим группам проводился с помощью свободно доступного программного обеспечения Neurostudio, согласно параметрам, описанным в [90].

5.Иммуногистохимия

Для количественного определения амилоидных бляшек через 60 дней после инъектирования проводилась транскраниальная перфузия 4% раствором параформальдегида, разведенного в (PBS). Для дальнейшего иммуногистохимического окрашивания использовались фиксированные срезы головного мозга толщиной 100 мкм. В ходе подбора условий стандартный протокол иммуногистохимического окрашивания был улучшен при помощи метода HCl antigen retrieval, так как предварительные данные показали, что наиболее качественная визуализация амилоидных скоплений в тканях мозга происходит при предварительном усилении окрашивания путем демаскировки антигена. После 20 минут инкубации с 2-нормальным раствором HCl срезы блокировались 5% BSA, разведенным в PBS с 0,25%-содержанием Triton X-100. После этого срезы инкубировались одну ночь в

растворе 6E10 первичных моноклональных антител (разведение 1:1000, Biolegend, Кат№ 803001, раствор в PBS с 5%-содержанием BSA и 0,125%-содержанием Triton X-100). После первичных антител, срезы инкубировались два часа со вторичными антителами Alexa Fluor-488 (anti-mouse, Invitrogen, Кат. №A11001), растворенными 1:1000 в PBS с 5%-содержанием BSA и 0,125%-содержанием Triton X-100. После чего заключали под покровные стекла с использованием монтирующей среды Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc., США) и производили анализ амилоидных бляшек на конфокальном микроскопе. Количество и общая площадь бляшек использовались в качестве параметров для оценки накопления β амилоида в головного мозга при помощи свободно доступного программного обеспечения Icy.

6. "Водный лабиринт Морриса"

Анализ восстановления когнитивных способностей у мышей линии 5FAD после вирус-опосредованной гиперэкспрессии белка Vcl-2 и его мутантной формы (Vcl-2K17D) проводился при помощи поведенческого теста "Водный лабиринт Морриса".

Установка для проведения теста представляет собой бассейн для воды из полипропилена на стальной подставке (НПК Открытая Наука (Open Science), TS1004-M2). Диаметр бассейна 150 см, высота 60 см без подставки. В комплект к бассейну входит регулируемая по высоте платформа диаметром 10 см из белого акрила, имеющая в основании металлический утяжелитель. Также на стенках бассейна выше уровня воды крест-накрест располагаются четыре черно-белых ориентира для помощи в навигации в поиске скрытой платформы. Дополнительно к потолку над центром бассейна установлена цифровая видеосистема VS 1304-1. Видеосистема состоит из высокочувствительной цифровой видеокамеры GigE Vision (DMK23GV024) и объектива Fujinon (YV5x2.7R4B-2). Управление видеосъемкой в ходе

эксперимента происходит при помощи бесплатного интерфейса Gigabit Ethernet со стационарного компьютера.

Протокол проведения теста «Водный Лабиринт Морриса»:

Поведенческий тест MWM состоит из 4 обучающих сессий, в которых мышь ищет спрятанную (погруженную на 0,5 см в непрозрачную воду) платформу в круглом бассейне, и одной тестовой сессии, когда платформа из бассейна убирается. Обучающая сессия состоит из 4 испытаний в один день, в одно и тоже время в одинаковых условиях в присутствии платформы, в последний 5 день проводится тестовая сессия, которая проводится в 1 испытание. Время каждого испытания составляет 1,5 минуты. Между испытаниями для каждой мыши должно пройти минимум 15 минут отдыха. Во время сессий бассейн наполняется наполовину 22°C водой. Время испытания начинает отсчитываться с момента опускания мыши в воду. Запуск мыши в бассейн осуществляется с 4-х разных стартовых позиций в псевдослучайном порядке, головой к стене. Животные, не находящие платформу в течение 90 секунд, направляются к ней и оставляется там на 15 секунд. Время начала эксперимента -15:00 ± 1 час.

7.Разрабатываемое программное обеспечение

Схема разработанного в данном исследовании ПО для автоматизации анализа MWM (получившее название «Minorontikos») включает в себя предварительную обработку входных данных, анализ данных и пост-обработку. Архитектура ПО показана на рисунке 3.

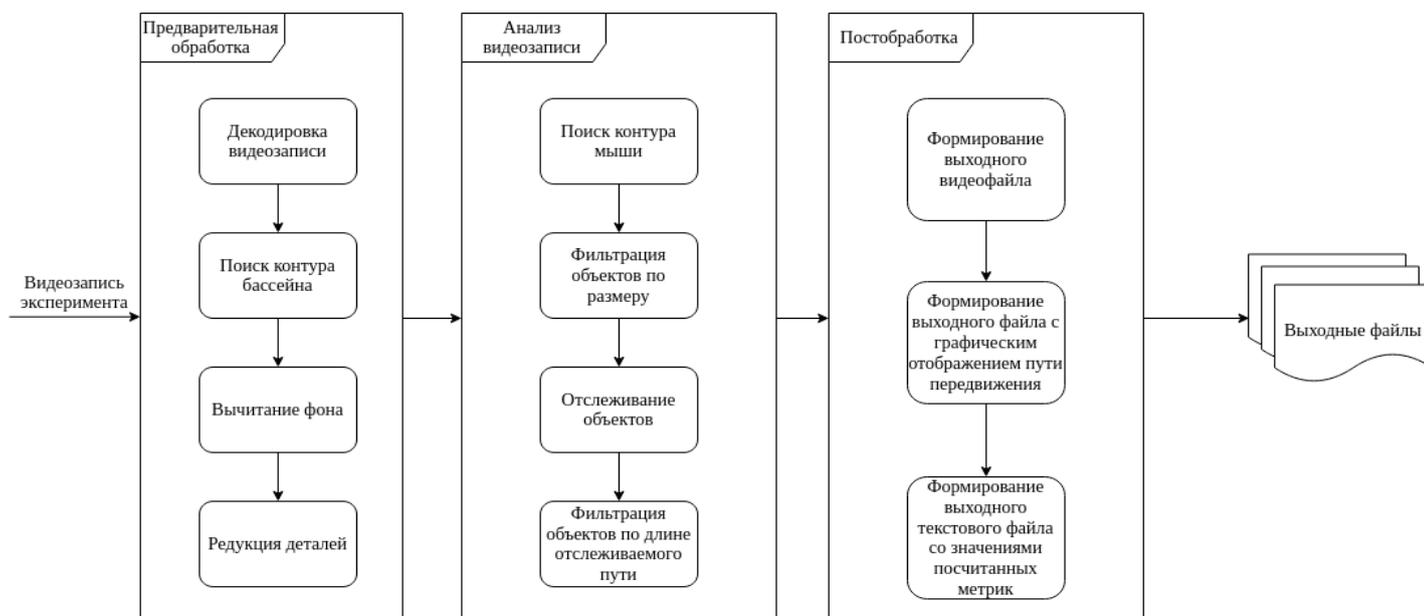


Рисунок 3. Структура разрабатываемого Minorontikos
Предварительная обработка данных

Предварительная обработка является первым этапом работы созданного ПО. Заключается она в смене кодировки видеозаписей с DVVIDEO на H.265. Данная функциональность реализована в виде библиотеки написанной на языке программирования Rust. Для корректной работы данной библиотеки необходимо наличие утилиты ffmpeg.

Необходимы также несколько этапов предобработки для поиска мыши на видеозаписи: определение бассейна для сужения области анализа; вычитание фона для уменьшения ложных обработок движения и размытие деталей, не представляющих интереса для анализа.

Для поиска бассейна на кадре применяется преобразование Хафа [91], которое использует процедуру голосования для поиска фигур относящихся к определенному классу. Использование данного алгоритма позволяет определить и ограничить анализируемую область размерами бассейна.

Так как Minorontikos – это программное обеспечение на основе компьютерного зрения, одним из главных этапов его предварительной

обработки является вычитание фона. Это позволяет удалить статический фон и оставить представляющие интерес динамические объекты. В тесте Морриса за динамический объект принимается плавающая в бассейне мышь, а бассейн принимается за статический объект.

Для вычленения динамического объекта (мыши) из статического фона (бассейна) применен алгоритм MOG2, который использует смеси гауссианов. Для постоянного обновления параметров в нем используются рекурсивные уравнения, которые также помогают в одновременном выборе соответствующего количества компонент для каждого пикселя [91, 92].

Далее для уменьшения влияния посторонних артефактов на анализ видеозаписи используется фильтр размывания Гаусса. Данный фильтр относится к размывающим изображения фильтрам и использует функцию Гаусса (ур.1) для подсчета трансформаций, применяемых к каждому пикселю на изображении. Использование данного фильтра в разрабатываемом ПО позволяет отсеять такие артефакты, как круги на воде и тени от анализируемой мыши.

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} * e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (1)$$

, где

x - расстояние от исходного пикселя по оси абсцисс;

y - расстояние от исходного пикселя по оси ординат;

σ - стандартное отклонение гауссовского распределения.

Анализ видеозаписи

После выполнения этапа предобработки поиск движущейся мыши в кадре сводится к поиску ее контура. Для обнаружения контура используется

алгоритм предложенный Сатоси Сузуки и Кейчи Эйбом [93], основанный на прогонных данных. Метод включает в себя трассировку прогонных данных по краям, применяет данные прогона в парах, состоящих из левого и правого краев объекта, которые получаются с помощью горизонтального сканирования линий слева направо на изображении.

Во время обработки появляется множество ложно-определенных объектов. Для их фильтрации используется отсеивание найденных объектов неподходящего размера (слишком маленькие и слишком большие) и те, которые выходят за рамки определенного в предобработке бассейна.

Второй важной задачей анализа видеозаписи является отслеживание передвижения детектированной мыши для дальнейшего измерения различных метрик. Для решения этой задачи используется фильтр Калмана, оценивающий вектор состояния, содержащий параметры цели, в частности положение и скорость, на основе динамической/измерительной модели. Для отслеживания движущихся объектов при помощи фильтра Калмана необходимо разработать динамическую модель движения цели. Наиболее популярной динамической моделью является модель постоянной скорости, предполагающая, что скорость является постоянной в течение интервала дискретизации. Эта модель использовалась во многих приложениях благодаря своей универсальности, эффективности и простоте [94]. Данный алгоритм позволяет не только отслеживать обнаружение мышей и строить их траекторию, но и детектировать мышей из всех обнаруженных объектов, допуская предположение, что самый длинный отслеживаемый путь принадлежит подопытным мышам. Если мышь не детектировалась на некоторых кадрах в случае окклюзии, используемый алгоритм отслеживания предполагает ее размещение и продолжает отслеживание на протяжении небольшого количества кадров.

Для сравнения функционирования разработанного ПО в данном исследовании также были использованы программные продукты VideoMot (TSE Systems) и EthoVision [42].

Статистическая обработка полученных результатов производилась при помощи программных продуктов Excel и GraphPad Prism. Использовались критерий Андерсона-Дарлинга (или Колмогорова-Смирнова, для определения свойства нормального распределения), t-критерий Стьюдента, U-критерий Манн-Уитни (между двумя выборками), однофакторный дисперсионный анализ и критерий Краскела-Уоллиса (сравнивая результаты трех выборок). Также для предварительной оценки равенства дисперсий переменных был использован тест Брауна-Форсайта (для трех выборок) или тест Левена (для двух выборок).

Результаты исследования

1. Minorontikos

Для сравнительного анализа объективности функционирования разработанного в данном исследовании ПО (Minorontikos) было выбрано 30 видеофайлов из эксперимента MWM с 10 трансгенными мышами 5FAD – четвертое испытание каждой из подопытных мышей за первый день обучения (10шт), за последний день обучения (10шт) и тестовое испытание, проводимое на пятый день (10шт).

Параметрами для сравнения были выбраны латентное время поиска платформы, процентное время нахождения в квадранте интереса, где находилась платформа, угловая ошибка поиска и количество пересечений зоны интереса, где ранее была размещена платформа (для тестового испытания). Результаты обчёта всех трёх программах представлены в таблице 1.

Таблица 1. Средние величины значений параметров (\pm стандартные ошибки), полученные с использованием трех разных программ. Статистически значимые различия между значениями параметров по критерию Брауна – Форсайта при $p < 0.05$ выделены жирным шрифтом.

Параметры	Результаты обсчета параметров, среднее \pm стандартная ошибка		
	Программы		
	VideoMot	EthoVision	Minorontikos
Латентное время поиска платформы в первый день обучения	64,29 \pm 11,16	63,22 \pm 11,70	64,95 \pm 11,20
Латентное время поиска платформы в последний день обучения	57,10 \pm 8,43	63,05 \pm 9,56	57,69 \pm 8,12
Процентное время нахождения в квадранте интереса в первый день обучения	35,46 \pm 9,50	33,67 \pm 8,88	31,55 \pm 9,85
Процентное время нахождения в квадранте	25,46 \pm 2,87	28,73 \pm 3,15	21,95 \pm 2,97

интереса в последний день обучения			
Процентное время нахождения в квадранте интереса в тестовый день	21,48±3,34	20,54±3,15	13,67±2,80
Угловая ошибка поиска в первый день обучения	34,20±17,84	7,13±28,18	39,62±6,68
Угловая ошибка поиска в последний день обучения	6,70±27,93	18,65±26,15	43,45±10,84
Угловая ошибка поиска в тестовый день	1,25±15,10	34,04±28,14	35,47±11,95
Количество пересечений зоны интереса в тестовый день	0,9±0,31	-	1,10±0,41

Дисперсионный анализ результатов обсчета одних и тех же видеофайлов с эксперимента MWM в трех программах выявил незначительные различия для двух ключевых параметров – латентного времени поиска платформы и процентного времени нахождения в квадранте интереса. Для латентного времени поиска в первый день обучения $p=0,994$, $F=0,006$, в последний - $p=0,869$, $F=0,141$ (тест Брауна – Форсайта). Тест Краскела-Уоллиса для первого дня обучения $p=0,915$, для последнего – $p=0,646$. Для процентного времени нахождения в квадранте интереса в первый, последний день обучения и в тестовый день результаты следующие: $p=0,958$ ($F=0,043$), $p=0,295$ ($F=1,278$), $p=0,171$ ($F=1,888$) по тесту Брауна-Форсайта, и $p=0,716$, $p=0,200$, $p=0,147$ по тесту Краскела-Уоллиса. Данные статистической обработки позволяют сделать вывод, что различия при подсчете процентного времени во всех трёх программах незначительны, как и для латентного времени поиска платформы.

Распределение значений латентного времени поиска мышами платформы показано на рисунке 4.

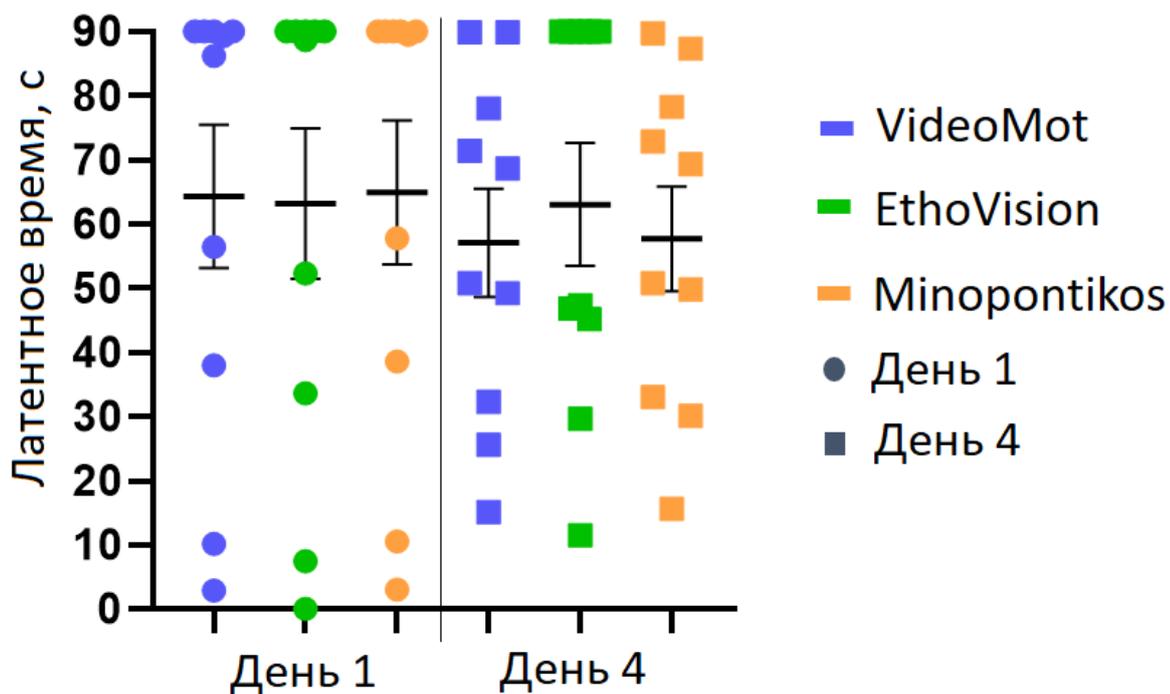


Рисунок 4. Распределение индивидуальных значений латентного времени поиска скрытой платформы в первый и последний день обучений (День 1 и День 4, соответственно), высчитанных при помощи трёх различных программ (VideoMot – выделено синим, EthoVision – зеленым, Minorontikos - оранжевым)

Распределение процентного времени в квадранте интереса представлено на рисунке 5.

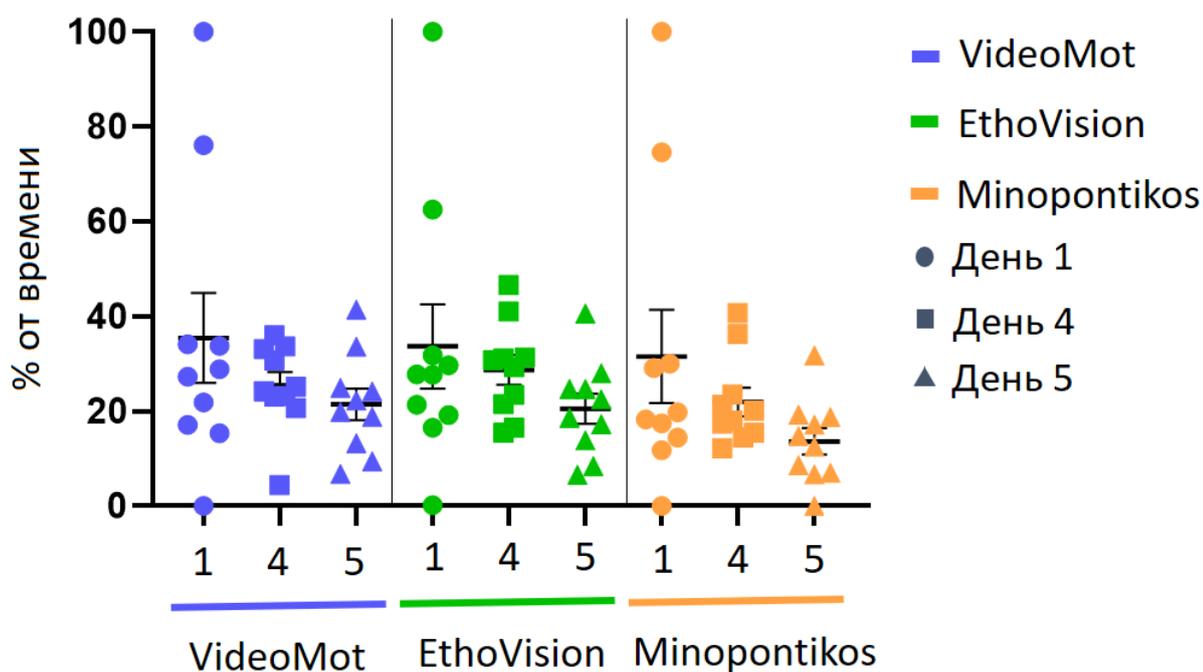
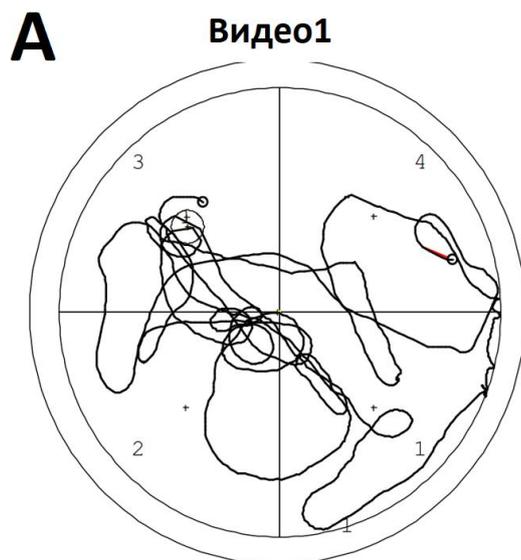


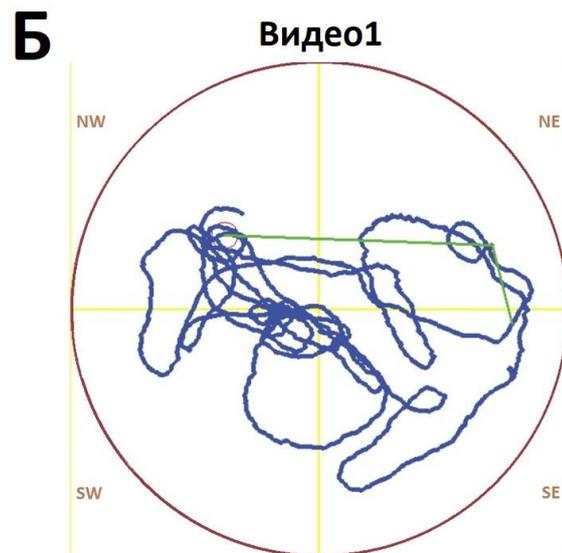
Рисунок 5. Распределение индивидуальных значений процентного времени нахождения в одном из квадрантов бассейна в первый и последний день обучений (День 1 (1) и День 4 (4), соответственно) и в тестовый день (День 5(5)), высчитанных при помощи трёх различных программ (VideoMot – выделено синим, EthoVision – зеленым, Minorontikos - оранжевым)

Кроме процентного времени нахождения в квадранте интереса для тестового испытания было подсчитано количество пересечений зоны интереса, где при обучении находилась платформа. Данный параметр был нами обнаружен в программе VideoMot, но не в EthoVision. При сравнении результатов обсчета VideoMot и Minorontikos, тест Левена показал $p=0,042$ ($F=4.261$), была выявлена разница только при обсчете двух видео, для которых количество пересечений в VideoMot равно 3 и 1, а в Minorontikos – 4 и 0, соответственно. Иллюстрации траектории движения мышей в данных видео представлены на рисунке 6.



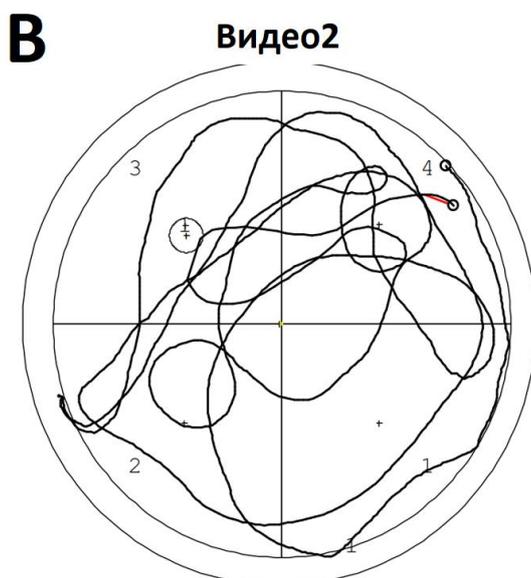
N=3

Угловая ошибка = $-15,52^\circ$



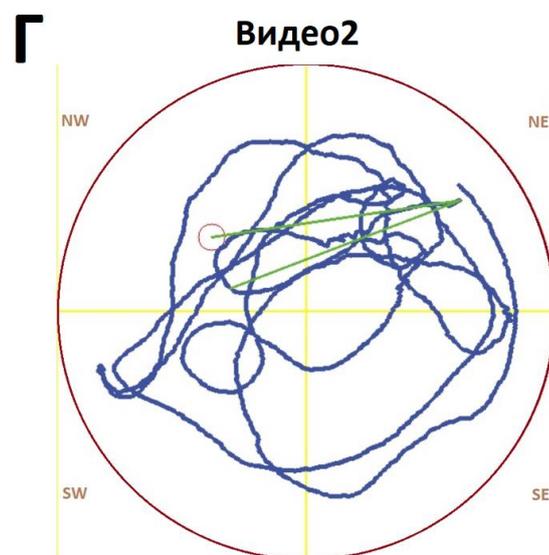
N=4

Угловая ошибка = $106,16^\circ$



N=1

Угловая ошибка = $-26,56^\circ$



N=0

Угловая ошибка = $12,62^\circ$

Рисунок 6. Траектории движения двух из подопытных мышей (1А,Б – видео1; 1В,Г - видео2) в тестовый день, детектированные двумя программами (VideoMot – 1А,В; Minorontikos – 1Б,Г). Траектории наложены на контур детектируемой зоны и зоны интереса, где ранее при обучении находилась платформа, также присутствует обозначение квадрантов бассейна (VideoMot – 1,2,3,4; Minorontikos – NW, SW, SE, NE). N – количество пересечений зоны интереса, рассчитанное программами.

Результаты статистической обработки выявили, что посчитанная угловая ошибка у всех программ значительно отличается, тест Брауна – Форсайта показал $p=0,0002$ ($F=9,247$). Это свидетельствует о том, что случайные различия в значениях данного параметра маловероятны.

2. Взаимодействие белков Vcl-2 и Vcl-2K17D с IP3R1 и RyR2.

Связывание белков Vcl-2-WT и Vcl-2K17D с белками IP3R1 и RyR2 определяли при помощи ко-иммунопреципитации и Вестерн-Блот анализа с образцами мышечной линии 5FAD, инжестированными аденоассоциированными вирусами, кодирующими белок Vcl-2 дикого типа и мутантную форму Vcl-2K17D (Рисунок 7). В качестве нагрузки использовалась 1/15 часть клеточного лизата, которую инкубировали с антителами. Наличие банды в пробе на уровне 320 кДа, соответствующего молекулярному весу IP3R1, свидетельствует о взаимодействии белков IP3R1 и Vcl-2 дикого типа (Рисунок 7). О взаимодействии белков Vcl-2 и RyR2 свидетельствует наличие банды в пробе на уровне 550 кДа.

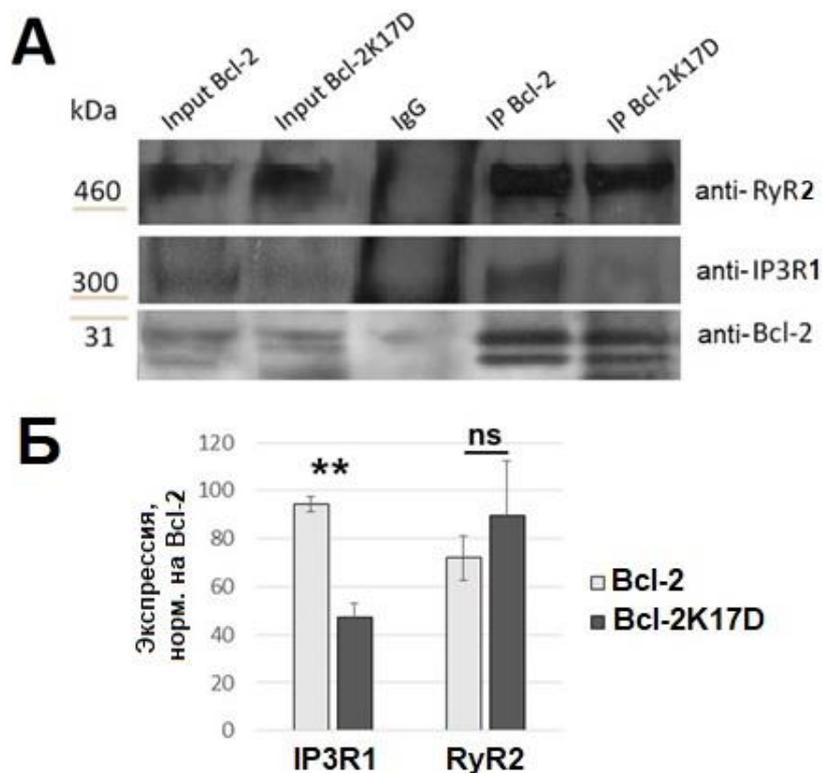


Рисунок 7. Результаты ко-иммунопреципитации IP3R1 и RyR2 из лизата гиппокампа взрослых мышей антителами к белку Bcl-2. А) Вестерн блот анализ иммунопреципитации IP3R1 и RyR2 из лизатов гиппокампа мышей линии 5FAD, инъектированных адено-ассоциированными вирусами, кодирующим белки Bcl-2 дикого типа и его мутантную форму Bcl-2K17D. Шкала слева – примерный молекулярный вес. Б) Гистограмма относительной экспрессии белков IP3R1 и RyR2, нормализованной по уровню экспрессии Bcl-2. Результаты представлены как среднее±стандартная ошибка. Эксперимент повторяли 3 раза. U-критерий: ns – нет статистической значимой разницы, ** $p < 0.005$.

Таим образом подтвердилось взаимодействие RyR2 с белками Bcl-2 дикого типа и его мутантной формы Bcl-2K17D, взаимодействие IP3R1 с Bcl-2 дикого типа, и значительно сниженное сродство между IP3R и мутантной формой Bcl-2K17D.

3. Анализ морфологии дендритных шипиков в гиппокампе мышей линии 5FAD после гиперэкспрессии белков Bcl-2.

Анализ морфологии дендритных шипиков происходил на шестимесячных мышцах 5FAD-M и WT-M. Результаты представлены на Рисунке 8.

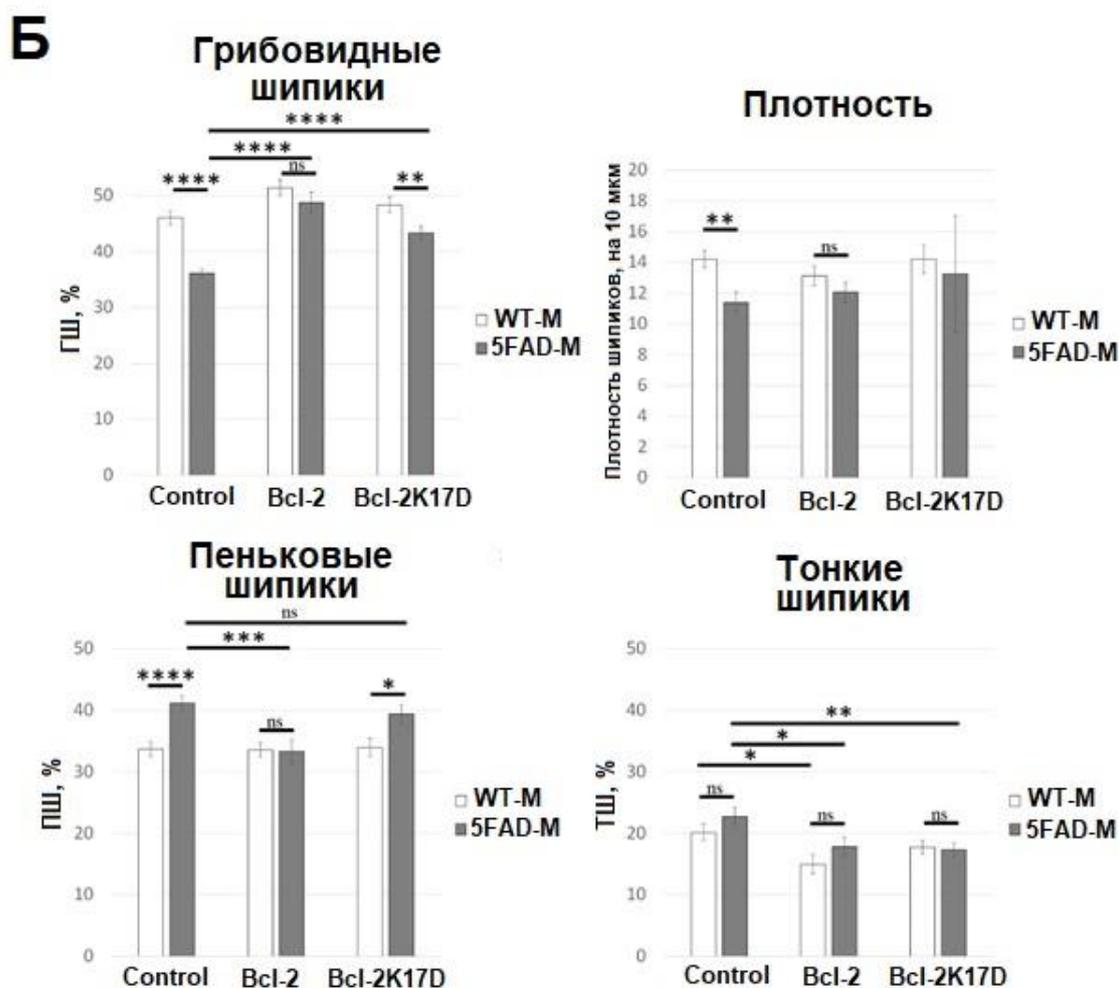
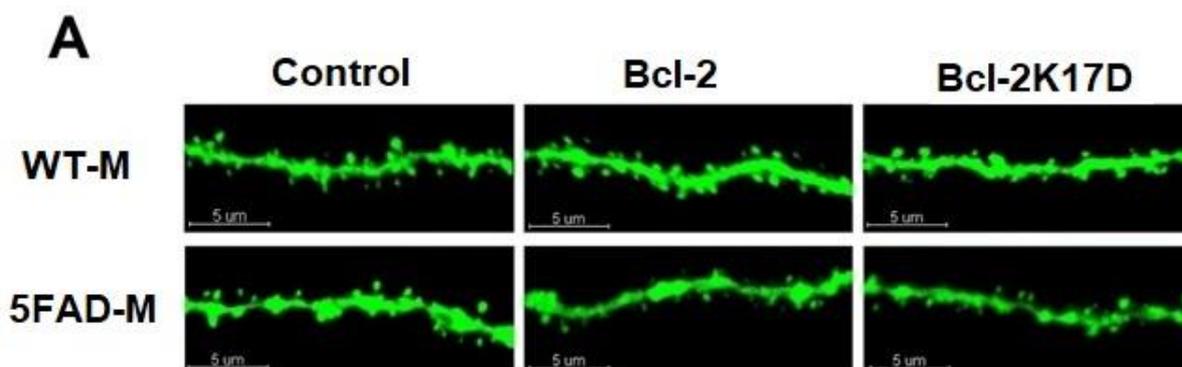


Рисунок 8. Микрофотографии фрагментов срезов гиппокампа мышей дикого типа (WT-M) и мышей линии 5FAD-M в возрасте 5,5 месяцев, инжесктивированных контрольным вирусом (Control), Vcl-2, Vcl-2K17D. А. Репрезентативные снимки дендритных шипиков в экспериментальных группах. Б. Гистограммы, иллюстрирующие плотность шипиков и процентные соотношения грибовидных (ГШ), пеньковых (ПШ) и тонких шипиков (ТШ) в экспериментальных группах. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n=21$ для каждой группы, ns – нет статистической значимой разницы, * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$, **** $p<0.0001$.

Согласно полученным данным между контрольными мышами M-line и 5FAD-M, инжесктивированных AAV2/7-Cherry вирусом, существует статистически значимая разница в процентном соотношении грибовидных и пеньковых шипиков, а также в плотности дендритных шипиков. Так у мышей M-line процент грибовидных шипиков составил $46.1\pm 1.2\%$, процент пеньковых шипиков $33.7\pm 1.2\%$, а плотность 14.2 ± 0.6 шипов на 10 мкм длины дендрита, в то время как у мышей трансгенной линии 5FAD-M эти показатели составили $36.1\pm 0.8\%$, $41.2\pm 1.2\%$ и 11.4 ± 0.7 шипиков на 10 мкм длины дендрита соответственно (Рисунок 8Б). Данный результат согласуется с литературными данными и неоднократно был подтвержден исследованиями нашей лаборатории.

После инжесктивирования Vcl-2 вируса мышам WT-M не наблюдалось изменений в морфологии дендритов, кроме снижения процента тонких шипиков, которое стало $15.0\pm 1.5\%$. У мышей же 5FAD-M наблюдались значительные изменения в виде увеличения процента грибовидных шипиков до $48.8\pm 1.9\%$, уменьшения процента пеньковых шипиков до $33.3\pm 1.8\%$ и тонких шипиков до $17.8\pm 1.5\%$. При этом в группах Vcl-2 дикого типа ни в одном из параметров нет разницы между WT-M и 5FAD-M мышами. После инжесктивирования Vcl-2K17D вируса мышам WT-M не наблюдалось значительных изменений в морфологии дендритных шипиков. У мышей 5FAD-M после инжесктивирования вируса Vcl-2K17D наблюдалось увеличение числа грибовидных шипиков до $43.3\pm 1.2\%$ и значительное снижение числа

тонких шипиков до $17.3 \pm 1.1\%$. Изменений процентности пеньковых шипиков и плотности шипов в этой группе обнаружено не было, однако наблюдался сильный разброс данных в плотности шипиков ($SEM=3.8$ шипиков на 10 мкм длины дендрита). Кроме того, в группах инжесктивированных Bcl-2K17D как и в группах, инжесктивированных контрольным вирусом, сохраняется разница между WT-M и 5FAD-M мышами в процентном соотношении числа грибовидных и пеньковых шипиков. Исходя из полученных результатов можно сделать следующий вывод: гиперэкспрессия Bcl-2-WT в CA1 области гиппокампа на ранних стадиях развития мышей трансгенной линии 5FAD способствует предотвращению синаптотоксического эффекта на нейроны гиппокампа в более зрелом возрасте. Происходит значительное увеличение процентного соотношения грибовидных шипиков и снижение пеньковых шипиков до уровня, наблюдаемого у здоровых мышей. Несмотря на то, что гиперэкспрессия мутантной формы белка Bcl-2 тоже имеет положительный эффект на процентное соотношение грибовидных и пеньковых шипиков, она не может привести к улучшению морфологии дендритных шипиков в мышцах 5FAD-M до уровня здоровых мышей.

4. Анализ числа амилоидных бляшек в мозге 5FAD мышей после гиперэкспрессии белков Bcl-2.

Подсчет числа амилоидных бляшек происходил на срезах мозга толщиной 100 мкм, сделанных на мышцах 5FAD и WT в возрасте 7 месяцев, которым в 3,5 месяца инжесктивировались контрольный вирус, Bcl-2 и Bcl-2K17D. Для расчета были выбраны 3 зоны - CA1 и CA3 области гиппокампа и область коры, находящаяся латерально над CA1. Для каждой группы в эксперименте участвовали 3 мыши, с каждой мыши было отснято билатерально по 3 среза, суммарно в каждой группе для каждой зоны $n=18$. По результатам этого эксперимента стало очевидно, что подсчет амилоидных бляшек в CA3 зоне гиппокампа не отображает очевидные особенности

трансгенной линии 5FAD, что согласуется с нашими предыдущими исследованиями [95], после чего было решено учитывать только области CA1 гиппокампа и коры. Результаты представлены на рисунках 9 и 10 для каждой из выбранных зон.

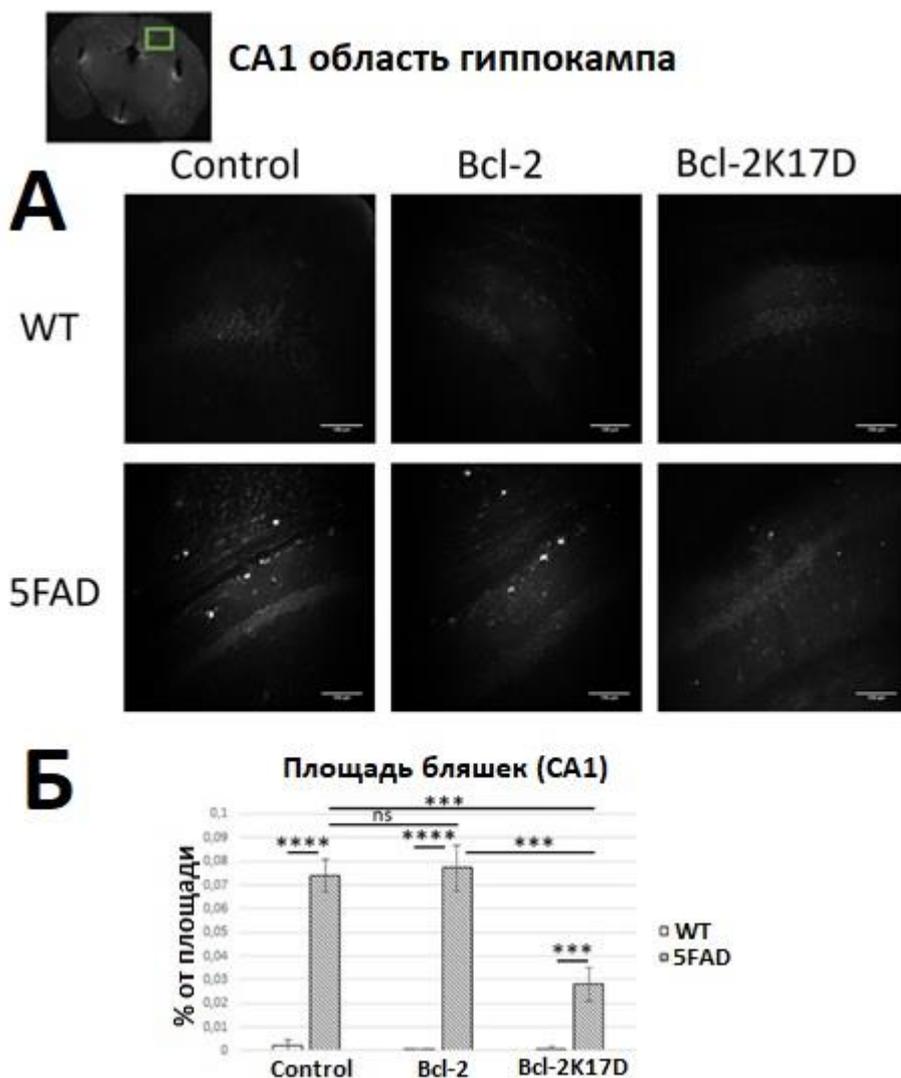


Рисунок 9. Результат подсчета числа амилоидных бляшек в области CA1 гиппокампа WT и 5FAD мышей, инжестированных контрольным, Bcl-2 и Bcl-2K17D вирусами. А) Репрезентативные микроснимки иммуногистохимического окрашивания антителами 6E10 100 мкм срезов мозга в зоне CA1 во всех экспериментальных группах. Шкала соответствует 100 мкм. Б) Гистограмма процентной площади, занимаемой бляшками в изучаемой области во всех экспериментальных группах. Результаты представлены как среднее±стандартная ошибка. n=18, ns – нет статистической значимой разницы, *** p<0.0005, **** p<0.0001.

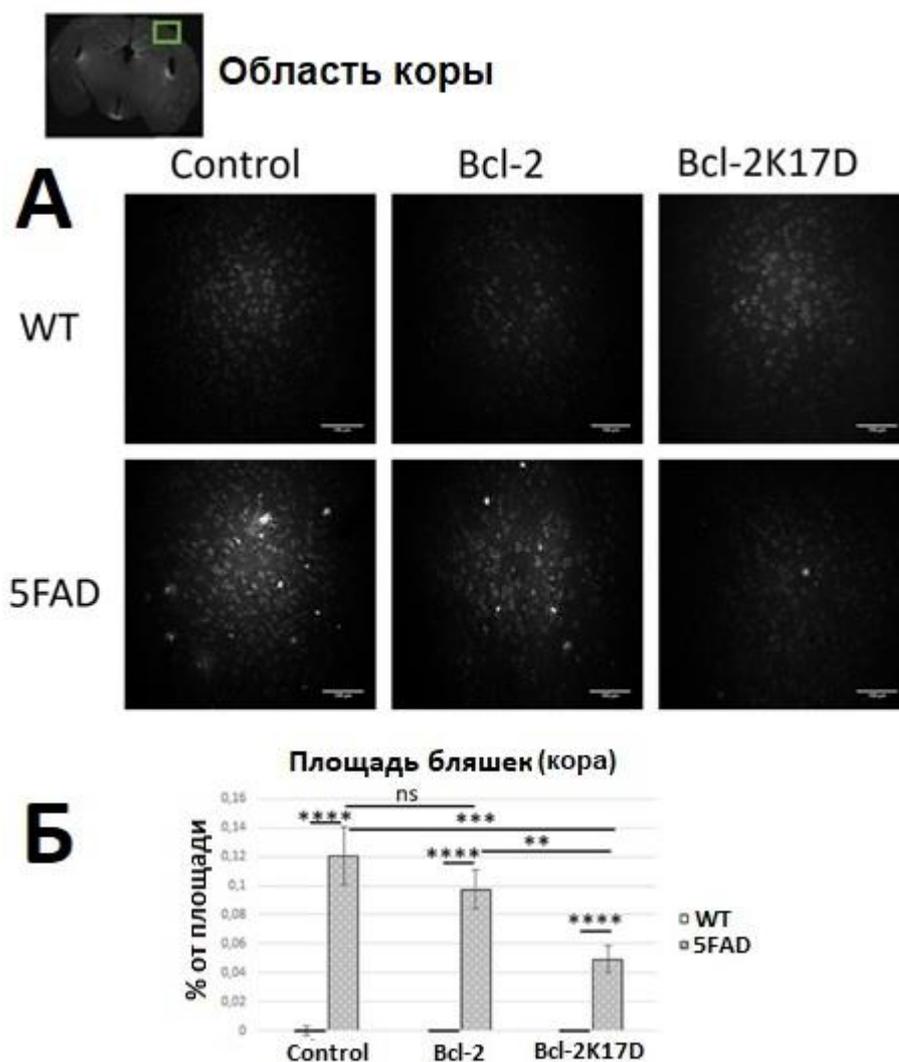


Рисунок 10. Результат подсчета числа амилоидных бляшек в области коры WT и 5FAD мышей, инжестированных контрольным, Bcl-2 и Bcl-2K17D вирусами. А) Репрезентативные микроснимки иммуногистохимического окрашивания антителами 6E10 100 мкм срезов мозга в зоне коры во всех экспериментальных группах. Шкала соответствует 100 мкм. Б) Гистограмма процентной площади, занимаемой бляшками в изучаемой области во всех экспериментальных группах. Результаты представлены как среднее±стандартная ошибка. n=18, ns – нет статистической значимой разницы, ** p<0.005, *** p<0.0005,**** p<0.0001.

Таким образом, гиперэкспрессия белка Bcl-2 дикого типа не снижает число амилоидных бляшек в мозге 5FAD ни в СА1 зоне гиппокампа, ни в коре. У мышей 5FAD, инжестированных контрольным вирусом, в СА1 области гиппокампа и в коре значения процентной площади, занимаемой амилоидными бляшками, составляют $0.074 \pm 0.007\%$ и $0.121 \pm 0.020\%$ соответственно. У 5FAD мышей с гиперэкспрессией Bcl-2 эти значения

0.077±0.010% и 0.097±0.013% соответственно. Зато после инжестирования вирусом, кодирующим мутантную форму Bcl-2K17D, в обеих исследуемых зонах произошло значительное сокращение числа амилоидных бляшек до 0.028±0.007% в СА1 области гиппокампа и до 0.049±0.009% в коре.

Из полученных данных можно сделать вывод, что гиперэкспрессия нативного белка Bcl-2 не обладает амилоид-протекторными свойствами, в отличие от его мутантной формы Bcl-2K17D.

5. Когнитивные функции 5FAD мышей после гиперэкспрессии белков Bcl-2.

Мыши инжестировались необходимыми вирусами в возрасте 3,5 месяцев, затем в возрасте 6 месяцев был проведен тест «Водный Лабиринт Морриса».

Результаты MWM представлены на рисунке 11.

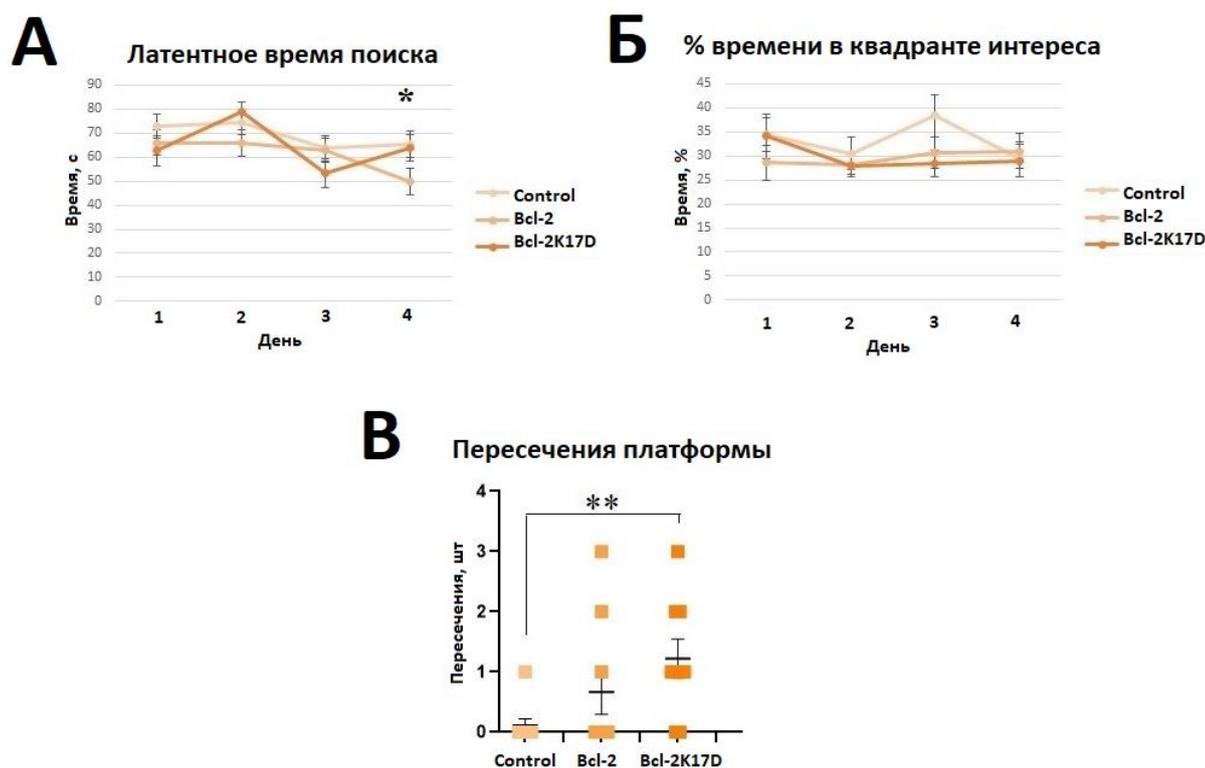


Рисунок 11. Результаты проведения «Водного Лабиринта Морриса» с 5FAD мышами, инжестированными контрольным (Control, n=8), Bcl-2 (n=10) и Bcl-2K17D (n=10) вирусами. В графиках латентного времени поиска платформы (А) и процентного времени, проведенного в квадранте интереса (Б), результаты представлены как средние значения группы за весь день

обучения \pm стандартная ошибка, для тестового дня в графике количества пересечений зоны, где ранее находилась платформа (В), показаны индивидуальные значения и среднее \pm стандартная ошибка, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Результаты проведения MWM свидетельствуют о том, что в контрольной группе 5FAD мышей во время тренировочных сессий обучения не происходит, латентное время поиска платформы не уменьшается, а время в квадранте интереса не увеличивается (Рисунок 11 А,Б). Почти такая же ситуация в группе 5FAD мышей с гиперэкспрессией мутантной формы Vcl-2 белка, но в отличие от контрольной группы, оба рассчитанных параметра имеют сильный разброс данных и «скачкообразную» кривую обучения (Рисунок 11 А,Б). Это свидетельствует о наличии некоторого эффекта после инъектирования, однако для выявления этого эффекта необходима более масштабная выборка, чем имеющаяся в данном эксперименте. Процентное время в квадранте интереса для группы 5FAD мышей с гиперэкспрессией нативной формы Vcl-2 белка также не показывает тенденции к уменьшению в процессе обучения (Рисунок 11 А), но в последний день обучения мыши этой группы сократили время поиска скрытой платформы и статистический анализ показал разницу между результатами этой группы и двумя остальными. Так статистическая разница по тесту Краскела-Уоллиса $p = 0.0165$ и $p = 0.0099$ ($F = 3.872$) по тесту Брауна-Форсайта. В тестовом дне также статистически значимые различия в числе пересечений зоны, где ранее находилась платформа, обнаружены только в группе 5FAD с гиперэкспрессией Vcl-2K17D (Рисунок 11 В). Так при использовании критерия Манн-Уитни между группами Control и Vcl-2K17D $p = 0.0097$, а статистическая разница между всеми тремя группами по тесту Краскела-Уоллиса $p = 0.0214$ и $p = 0.0424$ ($F = 3.614$) по тесту Брауна-Форсайта.

Обсуждение результатов

Созданное при выполнении данного исследования программное обеспечение получило название «Minorontikos». Первые же результаты и их сравнение с наиболее популярными коммерческими продуктами показали, что работа Minorontikos не уступает по функциональности и интерфейсу ни VideoMot, ни EthoVision. Наиболее стабильным параметром для вычисления во всех трёх программах является латентное время поиска платформы, более того, при более детальном статистическом анализе выявилось, что результаты двух коммерческих продуктов между собой отличаются сильнее, чем результат обсчета нашей программы с каждой из них по отдельности. Также различий не обнаружилось и при высчитывании процентного времени нахождения в квадранте интереса. Расчет параметра угловой ошибки выявил значительное различие результатов всех трёх программ. Анализ принципа работы всех программ показал, что вычисление угловой ошибки во всех программах происходит различными подходами. Так в программе VideoMot угол считывается между двумя прямыми соединяющими три точки – платформу, начальное положение животного и положение, которое занимает животное через 10 см пути (количество см можно менять), Minorontikos за третью точку берет положение животного через 5% от всего пройденного пути (процент также можно менять). Так как скорость передвижения и длина траектории за одно и тоже время у экспериментальных мышей могут сильно различаться и зависят от индивидуальных особенностей животного, параметр в процентах от всего пройденного пути выглядит более объективным, чем конкретное расстояние. Сравнительный анализ числа пересечений зоны интереса в данном исследовании стал возможен только между Minorontikos и VideoMot. Статистический анализ показал различие двух выборок, но более детальное рассмотрение расхождений работы двух программ выявило различие только в 2 из 10 видеофайлов. Траектории, детектируемые двумя программами, являются практически идентичными, а

разница в количестве пересечений обусловлена точностью выбора зоны, где ранее находилась платформа. В Minorontikos, как и в VideoMot, есть возможность использовать раннее сохраненную зону интереса (например, из видео, снятых в обучающих сессиях), которое до этого было выбрано пользователем вручную. А значит, положение выделенной зоны зависит только от человека, использующего программу.

Также при использовании коммерческих программ и нашего ПО выявилось одно отличие, которое можно записать в плюсы Minorontikos. Это автоматический отсчет времени начала движения испытуемого грызуна и автоматическое обрезание трека заданным пользователем временным интервалом. При обработке видеофайлов данный подход был более удобен, чем ручная обрезка в коммерческих программах. Данный функционал присутствует в коммерческих продуктах, однако часто срывает с ошибками, и пользователю всё равно приходится использовать ручную обрезку трека. Кроме того, VideoMot и EthoVision являются универсальными трекинговыми программами для обработки большого набора поведенческих тестов, поэтому их интерфейс очень большой и сильно перегружен, и требует много времени, чтобы разобраться в их функционале.

Полученные в данном исследовании результаты о роли белка Vcl-2 в молекулярных механизмах патогенеза БА в 5FAD трансгенной линии мышей позволяют сделать вывод о том, что белок Vcl-2 обладает синаптопротекторными свойствами и гиперэкспрессия его нативной формы в CA1 области гиппокампа 5FAD мышей сокращает потерю грибовидных шипиков и восстанавливает их число до уровня здоровых мышей. Мутантная форма Vcl-2K17D, в которой присутствует мутация в сайте связывания с IP3R1 на VN4 домене, также показала синаптопротекторные свойства, но ее действие менее выражено, чем у нативной формы. Проверка взаимодействия белков показала, что Vcl-2 связывается и с IP3R1, и с RyR2, а мутантная форма Vcl-2K17D хорошо взаимодействует с RyR2 и намного хуже с IP3R1.

Это согласуется с ранее полученными данными бельгийской команды ученых [22, 30]. Было выявлено, что сайт связывания белка Vcl-2 на IP3R1 обладает сильной гомологией с рианодиновыми рецепторами, и добавление ВН4 домена белка Vcl-2 способно сократить RyR-зависимый кальциевый выход из ЭР. Таким образом, было показано, что мутация K17D в ВН4 домене Vcl-2 белка снижает сродство молекулы только с IP3R1, но не затрагивает взаимодействие с RyR2.

В данном исследовании было проверено влияния гиперэкспрессии Vcl-2 и Vcl-2K17D на количество амилоидных бляшек в мозге 5FAD мышей. Выяснилось, что амилоид-протекторными свойствами обладает только мутантная форма Vcl-2 белка. Несколько исследовательских групп указывали на роль RyR в нарушении регуляции передачи сигналов Ca^{2+} , поскольку нейрональная экспрессия RyR была увеличена в различных мышечных моделях БА и клеточных линиях [37-42]. Сообщалось, что лечение дантроленом, ингибитором RyR, нормализует нарушенную передачу кальциевых сигналов в ЭР и уменьшает отложения A β [39]. Эти данные также согласуются с полученными нами результатами, и мы можем выдвинуть предположение, что на 5FAD мышечной модели болезни Альцгеймера ингибирование только RyR2-зависимого кальциевого выхода из ЭР приводит к большему терапевтическому эффекту, нежели блокировка и RyR2, и IP3R1 каналов. Мы можем также заключить, что на уровне морфологии нейронов лучшие синаптопротекторные свойства показывает именно нативная форма белка Vcl-2, однако при анализе эффекта на основной физиологический признак БА, амилоидные бляшки, наилучшим кандидатом в терапевтические агенты является мутантная форма Vcl-2K17D. На уровне синаптических контактов, блокировка двух каналов кальциевого выхода из ЭР является достаточной для сокращения дефектов при БА, но на тканевом уровне, возможно, положительный синаптопротекторный эффект нивелируется остальными функциями нативной формы Vcl-2.

Это предположение получило подтверждение и при проведении поведенческого теста. «Водный Лабиринт Морриса» показал, что гиперэкспрессия мутантной формы белка Vcl-2 на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера помогает избежать серьезных когнитивных нарушений в более зрелом возрасте. Так 5FAD мыши, проинжектированные в 3,5 месяца AAV-Vcl-2K17D вирусом в возрасте 6 месяцев показали улучшение пространственной памяти, по сравнению с контрольной группой 5FAD мышей. К сожалению, делать однозначные выводы по эффекту гиперэкспрессии Vcl-2 белков на процессы обучения невозможно, так как малая выборка и сильный разброс данных в группах Vcl-2 и Vcl-2K17D не позволяют объективно оценить разницу в результатах эксперимента.

Таким образом, мы можем сделать предположение, что взаимодействие Vcl-2 именно с RyR2 каналами обладает терапевтическими свойствами в рамках 5FAD мышинной модели наследственной формы БА. И данное молекулярный механизм актуален для дальнейшего изучения.

Заключение

1. Разработанная в данном исследовании программа Minorontikos для автоматизированного обсчета результатов поведенческого теста «Водный Лабиринт Морриса» успешно прошла апробацию в лабораторных условиях, отвечает всем нуждам пользователя при обработке MWM, имеет удобный интерфейс и функционал, при сравнении с коммерческими продуктами (VideoMot, ни EthoVision) не уступает им по качеству, а в некоторых случаях даже выигрывает, например, при высчитывании угловой ошибки поиска.

2. Результаты иммунопреципитации показали, что один из каналов утечки кальция из эндоплазматического ретикулума во внутриклеточное пространство белок RyR2 взаимодействует с белками Vcl-2 дикого типа и его мутантной формы Vcl-2K17D, второй же важный канал выхода кальция, белок IP3R1, взаимодействует с Vcl-2 дикого типа, а сродство между IP3R1 и мутантной формой Vcl-2K17D значительно снижено.

3. Гиперэкспрессия нативной формы белка Vcl-2 при помощи аденоассоциированных векторов в CA1 области гиппокампа на ранних стадиях развития патологии болезни Альцгеймера способствует предотвращению синаптотоксического эффекта у мышей трансгенной линии 5FAD в более зрелом возрасте. Несмотря на то, что гиперэкспрессия мутантной формы белка Vcl-2 тоже имеет положительный синаптопротекторный эффект, она не может привести к улучшению морфологии дендритных шипиков в мышцах 5FAD до уровня здоровых мышей.

4. Гиперэкспрессия нативного белка Vcl-2 у 5FAD мышей в возрасте 3,5 месяцев не показывает амилоид-протекторные свойства в зрелом возрасте ни в коре, ни в гиппокампе головного мозга животного. Однако мутантная форма Vcl-2K17D уменьшает число амилоидных бляшек в двух исследуемых зонах.

5. Когнитивные функции 5FAD мышей улучшаются после гиперэкспрессии мутантной формы Vcl-2K17D в CA1 области гиппокампа.

Это согласуется с результатами экспериментов по анализу амилоидных отложений в мозге 5FAD мышей, и дает сделать предположение, что в дополнении к анти-апоптотическим свойствам белка Bcl-2 взаимодействие его именно с RyR2 каналами обладает терапевтическим эффектом в рамках 5FAD мышинной модели наследственной формы БА.

Список литературы

1. Morris, G.P., I.A. Clark, and B. Vissel, *Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol Commun, 2014. **2**: p. 135.
2. Karran, E., M. Mercken, and B. De Strooper, *The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(9): p. 698-712.
3. Sevigny, J., et al., *The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease*. Nature, 2016. **537**(7618): p. 50-6.
4. Fischer, O., *Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz*. Monatsschr Psychiat Neurol., 1907. **1**(22): p. 361-72.
5. Katzman, R., *The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease. A Major Killer*. Arch Neurol. , 1976. **33**(4): p. 217-218.
6. Ferris S. H., d.L.M.J., Wolf A. P., Farkas T., Christman D. R., Reisberg B., Fowler J. S., Macgregor R., Goldman A., George A. E., Rampal S., *Positron emission tomography in the study of aging and senile dementia*. Neurobiol Aging, 1980. **1**(2): p. 127-31.
7. Frackowiak R. S., P.C., Legg N. J., Du Boulay G. H., Marshall J., Lenzi G. L., Jones T., *Regional cerebral oxygen supply and utilization in dementia. A clinical and physiological study with oxygen-15 and positron tomography*. Brain, 1981. **104**(Pt 4): p. 753-78.
8. Mony J. De Leon, A.E.G., Leonidas A. Stylopoulos, Gwenn Smith, Douglas C. Miller., *Early marker for Alzheimer's disease: the atrophic hippocampus*. The Lancet, 1989. **334**(8664): p. 672-673.
9. Dekosky ST, S.S., *Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity*. Ann Neurol., 1990. **27**(5): p. 457-64.
10. Terry RD, M.E., Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment*. Ann Neurol. , 1991 **30**(4): p. 572-80.
11. Mattson MP, C.B., Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE., *beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity*. J Neurosci., 1992. **12**(2): p. 376-89.
12. Bezprozvanny, I., *Calcium signaling and neurodegenerative diseases*. Trends Mol Med, 2009. **15**(3): p. 89-100.
13. Supnet, C. and I. Bezprozvanny, *Presenilins function in ER calcium leak and Alzheimer's disease pathogenesis*. Cell Calcium, 2011. **50**(3): p. 303-9.
14. Tu, H., et al., *Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations*. Cell, 2006. **126**.

15. Kasri, N.N., et al., *Up-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is responsible for a decreased endoplasmic-reticulum Ca(2+) content in presenilin double knock-out cells*. Cell Calcium, 2006. **40**(1): p. 41-51.
16. Shilling, D., et al., *Suppression of InsP3 receptor-mediated Ca²⁺ signaling alleviates mutant presenilin-linked familial Alzheimer's disease pathogenesis*. J Neurosci, 2014. **34**(20): p. 6910-23.
17. Wu, B., et al., *Presenilins regulate calcium homeostasis and presynaptic function via ryanodine receptors in hippocampal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(37): p. 15091-6.
18. Rossi, A.M. and C.W. Taylor, *IP3 receptors - lessons from analyses ex cellula*. J Cell Sci, 2018. **132**(4).
19. Baker, M.R., G. Fan, and Serysheva, II, *Structure of IP3R channel: high-resolution insights from cryo-EM*. Curr Opin Struct Biol, 2017. **46**: p. 38-47.
20. Prole, D.L. and C.W. Taylor, *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs*. J Physiol, 2016. **594**(11): p. 2849-66.
21. Yamazaki, Y., et al., *Activation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors during preconditioning low-frequency stimulation leads to reversal of long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons*. Neuroscience, 2012. **207**: p. 1-11.
22. Kania, E., et al., *IP3 Receptor-Mediated Calcium Signaling and Its Role in Autophagy in Cancer*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 140.
23. Ivanova, H., et al., *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(10): p. 2164-83.
24. Szymanski, J., et al., *Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
25. Bravo, R., et al., *Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 13): p. 2143-52.
26. MacVicar, T.D., et al., *Targeted siRNA Screens Identify ER-to-Mitochondrial Calcium Exchange in Autophagy and Mitophagy Responses in RPE1 Cells*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(6): p. 13356-80.
27. Decuypere, J.P., G. Bultynck, and J.B. Parys, *A dual role for Ca(2+) in autophagy regulation*. Cell Calcium, 2011. **50**(3): p. 242-50.
28. Monaco, G., et al., *Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl*. Cell Death Differ, 2012. **19**(2): p. 295-309.
29. Rong, Y.P., et al., *The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14397-402.
30. Davids, M.S. and A. Letai, *Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(25): p. 3127-35.

31. Rohn, T.T., et al., *Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2*. J Neurosci, 2008. **28**(12): p. 3051-9.
32. Brandeis, R., Y. Brandys, and S. Yehuda, *The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning*. Int J Neurosci, 1989. **48**(1-2): p. 29-69.
33. Nunn, J.A., et al., *Global ischaemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze*. Behav Brain Res, 1994. **62**(1): p. 41-54.
34. Gallagher, M. and P.R. Rapp, *The use of animal models to study the effects of aging on cognition*. Annu Rev Psychol, 1997. **48**: p. 339-370.
35. Bromley-Brits, K., Y. Deng, and W. Song, *Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice*. J Vis Exp, 2011(53).
36. Edwards, S.R., et al., *Comparative studies using the Morris water maze to assess spatial memory deficits in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014. **41**(10): p. 798-806.
37. Ge, M., et al., *Effects of mesenchymal stem cells transplantation on cognitive deficits in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis*. Brain Behav, 2018. **8**(7): p. e00982.
38. Hsiao, K., et al., *Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice*. Science, 1996. **274**(5284): p. 99-102.
39. Shariatpanahi, M., et al., *The involvement of protein kinase G inhibitor in regulation of apoptosis and autophagy markers in spatial memory deficit induced by Abeta*. Fundam Clin Pharmacol, 2016. **30**(4): p. 364-375.
40. Wu, M.N., et al., *Colivelin ameliorates amyloid beta peptide-induced impairments in spatial memory, synaptic plasticity, and calcium homeostasis in rats*. Hippocampus, 2015. **25**(3): p. 363-372.
41. D'Hooge, R. and P.P. De Deyn, *Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **36**(1): p. 60-90.
42. Noldus, L.P., A.J. Spink, and R.A. Tegelenbosch, *EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments*. Behav Res Methods Instrum Comput, 2001. **33**(3): p. 398-414.
43. Smolensky, I.V., et al., *Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy*. Behav Brain Res, 2019. **372**: p. 112044.
44. Bello-Arroyo, E., et al., *MouBeAT: A New and Open Toolbox for Guided Analysis of Behavioral Tests in Mice*. Front Behav Neurosci, 2018. **12**: p. 201.
45. Rodriguez, A., et al., *ToxTrac : A fast and robust software for tracking organisms*. Methods in Ecology and Evolution, 2018. **9**(3): p. 460-464.
46. Aragao Rda, S., et al., *Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents--a reproducibility study*. J Neurosci Methods, 2011. **195**(2): p. 216-221.

47. Popugaeva, E., C. Supnet, and I. Bezprozvanny, *Presenilins, deranged calcium homeostasis, synaptic loss and dysfunction in Alzheimer's disease*. Messenger, 2012. **1**: p. 53-62.
48. Popugaeva, E., et al., *STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity*. Mol Neurodegener, 2015. **10**(1): p. 37.
49. Sun, S., et al., *Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store-Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice*. Neuron, 2014. **82**(1): p. 79-93.
50. Zhang, H., et al., *Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease*. J Neurosci, 2015. **35**(39): p. 13275-86.
51. Pivovarova, N.B. and S.B. Andrews, *Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons*. FEBS J, 2010. **277**(18): p. 3622-36.
52. Loncke, J., et al., *Balancing ER-Mitochondrial Ca(2+) Fluxes in Health and Disease*. Trends Cell Biol, 2021. **31**(7): p. 598-612.
53. Hayashi, T. and T.P. Su, *Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival*. Cell 2007. **131**: p. 596–610.
54. Szabadkai, G., et al., *Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 901-11.
55. Carreras-Sureda, A., et al., *Non-canonical function of IRE1alpha determines mitochondria-associated endoplasmic reticulum composition to control calcium transfer and bioenergetics*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(6): p. 755-767.
56. Filadi, R., et al., *TOM70 Sustains Cell Bioenergetics by Promoting IP3R3-Mediated ER to Mitochondria Ca(2+) Transfer*. Curr Biol, 2018. **28**(3): p. 369-382 e6.
57. Loncke, J., et al., *Recent advances in understanding IP3R function with focus on ER-mitochondrial Ca²⁺ transfers*. Curr Opin Physiol., 2020(17): p. 80–88.
58. Cardenas, C., et al., *Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria*. Cell, 2010. **142**(2): p. 270-83.
59. Evans, R.C. and K.T. Blackwell, *Calcium: amplitude, duration, or location?* Biol Bull, 2015. **228**(1): p. 75-83.
60. L., J.M.K.C.W.C.A.J.S.R.E.D.E.C.G. and S.H.C.H.Z.X.M.E. Greenberg, *CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events*. Neuron, 2002(34): p. 221–233.
61. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
62. Sabatini, B.L., T.G. Oertner, and K. Svoboda, *The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines*. Neuron, 2002. **33**(3): p. 439-52.

63. Brunelle, J.K. and A. Letai, *Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 4): p. 437-41.
64. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 621-32.
65. K.J., H.I.L.E.W.I.I.A.T.E.T.L.K.W. and A.L.W.K.H.K. Mikoshiba, *Bcl-2 and IP3 compete for the ligand-binding domain of IP3Rs modulating Ca²⁺ signaling output*. 2019: p. 3843–3859.
66. Baffy, G., et al., *Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6511-9.
67. He, H., et al., *Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2*. J Cell Biol, 1997. **138**(6): p. 1219-28.
68. Magnelli, L., et al., *Bcl-2 overexpression abolishes early calcium waving preceding apoptosis in NIH-3T3 murine fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **204**(1): p. 84-90.
69. Scorrano, L., et al., *BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis*. Science, 2003. **300**(5616): p. 135-9.
70. Callens, M., et al., *The role of Bcl-2 proteins in modulating neuronal Ca(2+) signaling in health and in Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2021. **1868**(6): p. 118997.
71. Vervliet, T., et al., *Bcl-2 binds to and inhibits ryanodine receptors*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 12): p. 2782-92.
72. Kitamura, Y., et al., *Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease*. Brain Res, 1998. **780**(2): p. 260-9.
73. Shimohama, S., et al., *Differential expression of rat brain bcl-2 family proteins in development and aging*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(1): p. 92-6.
74. O'Barr, S., J. Schultz, and J. Rogers, *Expression of the protooncogene bcl-2 in Alzheimer's disease brain*. Neurobiol Aging, 1996. **17**(1): p. 131-6.
75. Su, J.H., et al., *Up-regulation of Bcl-2 is associated with neuronal DNA damage in Alzheimer's disease*. Neuroreport, 1996. **7**(2): p. 437-40.
76. Schaefer, A., et al., *Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1553-8.
77. Kim, Y.J., et al., *miR-16-5p is upregulated by amyloid beta deposition in Alzheimer's disease models and induces neuronal cell apoptosis through direct targeting and suppression of BCL-2*. Exp Gerontol, 2020. **136**: p. 110954.
78. Bhatnagar, S., et al., *Increased microRNA-34c abundance in Alzheimer's disease circulating blood plasma*. Front Mol Neurosci, 2014. **7**: p. 2.
79. Schipper, H.M., et al., *MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells*. Gene Regul Syst Bio, 2007. **1**: p. 263-74.

80. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
81. Ureshino, R.P., et al., *Alterations in calcium signaling and a decrease in Bcl-2 expression: possible correlation with apoptosis in aged striatum*. J Neurosci Res, 2010. **88**(2): p. 438-47.
82. Ghosh, D., K.R. LeVault, and G.J. Brewer, *Dual-energy precursor and nuclear erythroid-related factor 2 activator treatment additively improve redox glutathione levels and neuron survival in aging and Alzheimer mouse neurons upstream of reactive oxygen species*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(1): p. 179-90.
83. Morris, R.G.M., *Spatial localization does not require the presence of local cues*. Learning and Motivation, 1981. **12**(2): p. 239–260.
84. Morris, R.G.M., *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat* Journal of Neuroscience Methods, 1984. **11**(1): p. 47–60.
85. Morgan, D., *Water Maze Tasks in Mice: Special Reference to Alzheimer's Transgenic Mice*, in *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, nd and J.J. Buccafusco, Editors. 2009: Boca Raton (FL).
86. Morris, R.G.M., *Morris water maze*, in *Scholarpedia*. 2008. p. 6315.
87. Spink, A.J., et al., *The EthoVision video tracking system--a tool for behavioral phenotyping of transgenic mice*. Physiol Behav, 2001. **73**(5): p. 731-744.
88. Khotskin, N.V.K., V.A.; Zavyalov, E.L; Fursenko, D.V.; Kulikov, A.V. , *Conducting and automating Morris water maze test under SPF conditions*. Russ J Genet Appl Res, 2016. **6**: p. 394–399.
89. Bootman, M.D. and G. Bultynck, *Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020. **12**(1).
90. Rodriguez, A., et al., *Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1997.
91. Zivkovic, Z.v.d.H., F. , *Efficient adaptive density estimation per image pixel for the task of background subtraction*. Pattern recognition letters, 2006. **27**(7): p. 773 - 780.
92. Zivkovic, Z., *Improved adaptive Gaussian mixture model for background subtraction*, in *Proceedings of the 17th International Conference on Pattern Recognition, ICPR 2004*. 2004: Cambridge. p. 28-31.
93. Abe, S.S.K., *Topological structural analysis of digitized binary images by border following*. Computer Vision, Graphics, and Image Processing, 1985. **30**(1): p. 32-46.
94. Saho, K., *Kalman Filter for Moving Object Tracking: Performance Analysis and Filter Design*. Kalman Filters - Theory for Advanced Applications, 2018.

95. Li, C., et al., *Ethnic sensitivity assessment of the antibody-drug conjugate trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016. **78**(3): p. 547-58.