

ИНГИБИТОР JNK (с-Jun N-ТЕРМИНАЛЬНОЙ КИНАЗЫ) IQ-1S ПОДАВЛЯЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ МОЗГА КРЫС OXYS

© 2023 г. А. А. Жданкина^{1, *}, А. Н. Осипенко¹, Д. И. Тихонов¹, С. В. Логвинов¹,
М. Б. Плотников², А. И. Хлебников³, Н. Г. Колосова⁴

¹ Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный
медицинский университет, Томск, Россия

² “Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга”
Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук”, Томск, Россия

³ Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера, Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования “Томский политехнический университет”, Томск, Россия

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 09.02.2023 г.

После доработки 01.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

По данным международной организации Alzheimer’s Disease International (ADI) в мире около 50 млн человек страдает Болезнью Альцгеймера (БА). Однако эффективных методов профилактики и замедления прогрессии БА не существует. Ингибирование сигнального пути N-концевой киназы с-Jun (JNK) обсуждается как альтернативный способ профилактики развития БА и других нейродегенеративных заболеваний. В настоящем исследовании мы оценивали способность недавно обнаруженного селективного ингибитора JNK3 – натриевой соли 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима (IQ-1S) подавлять нейродегенеративные процессы у крыс OXYS на ранней стадии развития признаков БА в возрасте с 4.5 до 6 мес. Лечение IQ-1S (50 мг/кг внутривенно) привело к подавлению развития нейродегенеративных процессов в коре мозга крыс OXYS: увеличению доли неизмененных нейронов, снижению доли нейронов с признаками деструкции и необратимых повреждений, нормализации показателя глионейронального индекса. Одним из возможных механизмов нейропротекторного действия JNK3 может быть улучшение микроциркуляции в мозговой ткани за счет снижения выраженности синдрома повышенной вязкости крови у крыс OXYS. Применение ингибитора JNK3 IQ-1S может стать перспективной стратегией для профилактики ранних нейродегенеративных нарушений и, возможно, лечения БА.

Ключевые слова: старение мозга, нейродегенерация, крысы OXYS, ингибитор JNK, натриевая соль 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима, реологические свойства крови

DOI: 10.31857/S1027813323030214, EDN: YVJZKI

ВВЕДЕНИЕ

Возраст – основной фактор риска Болезни Альцгеймера (БА), которая становится самой распространенной причиной сенильной деменции. По данным международной организации Alzheimer’s Disease International (ADI) в мире около 50 млн человек страдает БА и, по прогнозам, это количество будет удваиваться каждые 20 лет [1]. В связи с этим особую актуальность приобрела разработка способов профилактики БА: согласно прогнозу, создание к 2025 г. способа задержки начала заболевания на 5 лет могло бы снизить в 2050 г. количество страдающих им людей на 50% [2]. Од-

нако эффективных методов профилактики и замедления прогрессии БА не существует, несмотря на значительные инвестиции в их разработку. В значительной мере это обусловлено тем, что стратегия создания лекарственных средств для лечения БА в течение последних 30 лет была направлена на амилоидную патологию как центральное событие в патогенезе заболевания. Однако существенное расширение представлений о наиболее распространенной (>95% случаев) спорадической форме БА как заболевании многофакторной природы показало, что оптимальным подходом к его лечению может стать терапия, способная воздействовать на системные механизмы старения, которые лежат в основе всех связанных с ним заболеваний. Как одна из потенциальных мишеней

* Адресат для корреспонденции: 634050 Томск, ул. Учебная, 39, e-mail: annazhdank@yandex.ru.

для таких воздействий рассматривается эволюционно консервативный сигнальный путь N-концевой киназы c-Jun (JNK) [3]. JNK — член семейства митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), представленный тремя изоформами: JNK1, JNK2 и JNK3. JNKs фосфорилируют множество транскрипционных факторов, связанных с апоптозом, и индуцируют его [3]. В отличие от JNK1 и JNK2, JNK3 в основном экспрессируется в головном мозге, JNK3 фосфорилирует белок-предшественник амилоида APP и способствует его превращению в амилоид бета. Также JNK3 непосредственно фосфорилирует тау-белок, регулируя образование нейрофибриллярных клубков [4–6]. Ранее сообщалось об активации JNK3 в головном мозге пациентов с семейной формой БА и о том, что ее уровень коррелирует со снижением когнитивных функций у пациентов [7]. В настоящее время активно проводится поиск ингибиторов JNK3, многие из которых уже подтвердили свою эффективность на различных моделях ранней (наследственной) формы БА [8, 9]. В настоящем исследовании нами проведена оценка нейропротекторных эффектов нового селективного ингибитора JNK — натриевой соли 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима (IQ-1S), которая, как было установлено в экспериментах *in silico* и *in vitro*, обладает повышенным аффинитетом в отношении JNK3 [10–12]. Исследование выполнено на крысах OXYS — модели преждевременного старения, одним из проявлений которого становится ускоренное старение мозга, сопровождающееся спонтанным развитием всех ключевых признаков БА. Их последовательность: дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование тау-белка, синаптическая недостаточность, деструктивные изменения нейронов, нарушения поведения и снижение когнитивных функций на ранних стадиях и их прогрессия на фоне повышения уровня белка-предшественника амилоида APP, усиленного накопления амилоида бета и образования амилоидных бляшек в мозге — соответствует современным представлениям о патогенезе спорадической формы БА [13]. Отсутствие характерных для ранней формы заболевания мутаций в генах *App*, *Psen1* и *Psen2* позволяет рассматривать крыс OXYS как уникальную модель спорадической формы БА [14]. Уже в молодом возрасте у этих животных наблюдаются явления цереброваскулярной дисфункции [15] и нарушение реологических свойств крови [16], последнее приводит к снижению эффективности транспорта кислорода, а гипоксия мозговой ткани, как известно, способствует ускоренному снижению когнитивных функций и развитию БА [17]. Недавно мы показали, что IQ-1S способен угнетать развитие у крыс OXYS признаков возрастной макулярной дегенерации, которая также становится проявлением преждевременного старения этих животных [18]. Целью настоящего

исследования явилась оценка способности IQ-1S влиять на развитие нейродегенеративных процессов в коре мозга, на состояние церебральных сосудов и на реологические свойства крови на ранних стадиях развития признаков БА у крыс OXYS.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на крысах самцах сток Вистар и линии OXYS, которые были получены из ЦКП “Генофонды лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН, в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных (“Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях”). Крысы содержали группами по пять особей в клетках размером 57 × 36 × 20 см при температуре 22 ± 2°C в условиях фиксированного режима освещения (12 ч свет/12 ч темнота) при свободном доступе к воде и пище — стандартному гранулированному корму для лабораторных животных (Чара, ЗАО “Ассортимент Агро”, Россия). Для оценки эффектов IQ-1S 4-месячные крысы OXYS были случайным образом распределены на две группы по 10 животных. Крысам OXYS опытной группы в течение 45 дней (с возраста 4.5 до 6 мес.) внутрижелудочно вводили IQ-1S в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 мл 1% крахмальной слизи. Крысы OXYS контрольной группы получали крахмальную слизь. Дополнительным контролем служили 10 крыс Вистар, которым также ежедневно вводили крахмальную слизь. Исследование на животных одобрено комиссией по биоэтике СибГМУ (протокол № 4008/4/06/2022 от 20.06.2022). Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму количество используемых животных и их дискомфорт. Эвтаназию осуществляли ингаляцией CO₂.

IQ-1S. Натриевую соль 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима (IQ-1S) (серия M314) синтезировали, как описано ранее [10], на кафедре биотехнологии и органической химии Томского политехнического университета, Томск, Россия. Химическая структура IQ-1S подтверждена методами масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса; чистота субстанции составила 99.9%. Для приготовления суспензии навеску порошка IQ-1S, соответствующую надлежащей дозе для животного, асептически растирали пестиком с 20 мкл Tween 80; добавляли 2 мл 1% крахмальной слизи для создания суспензии.

Гистологическое исследование. Для гистологического исследования мозг экспериментальных животных фиксировали в 10% нейтральном формальдегиде на 0.1 моль/л фосфатном буфере (pH 7.4) и заливали в парафин по стандартной методике [20], делали серийные фронтальные срезы (толщиной от 4 до 5 мкм), окрашивали толуиди-

новым синим по методу Ниссля, выделяли сенсомоторную область коры головного мозга (поля Fpa и Fpp) с использованием стереотаксического атласа мозга взрослой крысы [21] и исследовали с помощью микроскопа (AxioStar Plus, Carl Zeiss, Германия). Морфометрические параметры измеряли с помощью количественного анализа изображений, выполненного с помощью программного обеспечения Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY). Оценку проводили путем исследования пяти срезов мозга каждого животного при увеличении 10×100 с использованием кадра площадью 900 мкм^2 . Измеряли удельную площадь сосудов (открытых и со стазом, сладжем или тромбозом). Отдельно подсчитывали количество нейронов с центральным и тотальным хроматолизом, гиперхромных нейронов без признаков сморщивания и гиперхромных сморщенных нейронов, а также перинейрональных глиоцитов с ядерным пикнозом и отеком перикариона на 200 соответствующих клеток II, IV и V слоев коры. Рассчитывали численную плотность ядер нейронов и перинейрональных глиоцитов в окулярной рамке 900 мкм^2 , которые затем пересчитывали на площадь 1 мм^2 среза.

Электронная микроскопия. Образцы сенсомоторной области коры головного мозга контрольных и опытных крыс OXYS и крыс Wistar ($n = 5$ в группе) фиксировали 2.5% глутаральдегидом в 0.1 М буфере какодилата натрия (pH 7.2) в течение 1 ч, промывали 0.1 М буфером какодилата натрия и постфиксировали в 1% четырехокиси осмия в том же буфере в течение 1 ч. После этого образцы промывали водой и инкубировали в 1% водном растворе уранилацетата в темноте при КТ в течение 1 ч. Затем образцы обезвоживали, используя градуированную серию смесей этанола и ацетона, и заливали смесью эпон-аралдитных смол. Сначала на ультратоме делали полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим, затем делали ультратонкие срезы. Ультратонкие срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца, а затем исследовали под просвечивающим электронным микроскопом (JEM 100 SX; Jeol, Токио, Япония) в Межведомственном объединенном центре микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики РАН. На электронных микрофотографиях сенсомоторной области коры головного мозга (по 45 фото на группу животных) все органеллы, расположенные в этих областях, окрашивали с помощью программы Adobe Photoshop. Для каждой фотографии определяли следующий параметр: удельную суммарную площадь каждого типа органелл, расположенных в электроннопрозрачных участках нейронов.

Гемореологические показатели. Для оценки гемореологических параметров пробы крови забирала у наркотизированных диэтиловым эфиром

крыс из общей сонной артерии. Кровь стабилизировали 3.8% раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1. Вязкость цельной крови измеряли на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II + Pro с системой “конус/плоскость” при температуре 36°C в диапазоне скоростей сдвига от 15 до 450 с^{-1} , вязкость плазмы — при скорости сдвига 450 с^{-1} . Гематокрит определяли методом центрифугирования в стеклянных капиллярах (центрифуга PC-6, 2000 об./мин, время центрифугирования 15 мин) и выражали в процентах. Концентрацию фибриногена в плазме оценивали методом тромбообразования Клауса с использованием набора реагентов для определения концентрации фибриногена “Фибриноген-тест” на гемокоагулометре “Cognat KG-4”. Деформируемость эритроцитов исследовали на анализаторе RheoScan-AnD 300 диапазоне напряжений сдвига 7–20 Па. Индекс доставки тканям кислорода рассчитывали, как отношение вязкости цельной крови к гематокриту [22].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10 (Statsoft, США) с использованием методов вариационной статистики. Нормальность распределения выборки определяли при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий при сравнении средних значений использовали непараметрические критерии Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Экспериментальные данные в тексте представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

IQ-1S ослабляет дегенеративные изменения в коре головного мозга крыс OXYS. Как показало настоящее исследование, в сенсомоторной области коры головного мозга контрольных крыс OXYS в возрасте 6 мес. признаки нейродегенерации были достаточно ярко выражены во всех слоях: выявлялись отеки перикарионов нейронов, глии, сосудов, микроциркуляторные нарушения, конденсация хроматина с развитием гиперхроматоза ядер со сморщиванием и без него, хроматолиз нейронов различной степени выраженности. Все эти изменения были видны как на обзорных снимках, так и при большом увеличении (рис. 1).

Количественная оценка выявила во всех исследованных слоях коры мозга крыс OXYS увеличение доли нейронов, измененных по темному типу — с развитием гиперхроматоза ядер и цитоплазмы, и по светлому типу — с растворением хроматофильной субстанции и развитием хроматолиза. Об этом свидетельствует достоверное увеличение у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар процента гиперхромных нейронов со сморщива-

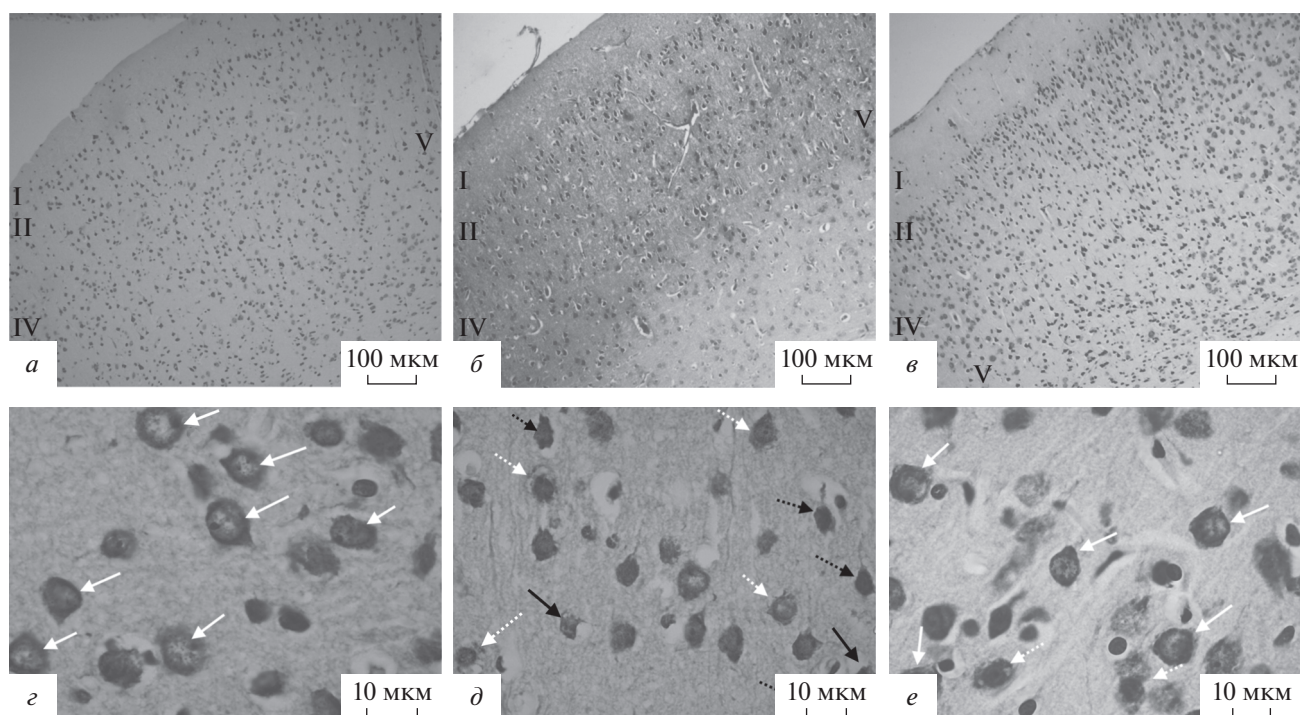


Рис. 1. Кора головного мозга крыс Вистар (*a, e*), контрольных крыс OXYS (*б, д*) и крыс OXYS, получавших IQ-1S (*в, е*). *a, б, в* – обзорные снимки, *г, д, е* – IV слой коры. На обзорном снимке контрольных крыс OXYS (*б*) видны выраженные деструктивные изменения нейронов и глии. У крыс Вистар преобладают нормохромные нейроны (белые стрелки), в ядрах определяются ядрышки. У крыс OXYS контрольной группы наблюдаются деструктивные изменения нейронов – по темному типу с конденсацией хроматина, сморщиванием ядра и цитоплазмы (черные пунктирные стрелки), по светлому типу: очаговый хроматолиз (белые пунктирные стрелки), тотальный хроматолиз (черные стрелки). Под влиянием IQ1S необратимых повреждений клеток становится меньше. Окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю (*a, в, г, д, е*), толуидиновым синим (*б*).

нием ядра и цитоплазмы, свидетельствующих о необратимом их повреждении и гиперхромных нейронов без сморщивания, появление которых связывают либо с увеличением, либо снижением их функциональной активности [23], а также нейронов с тотальным и очаговым хроматолизом. Пирамидные нейроны II и V слоев коры крыс OXYS более подвержены изменениям по темному типу, тогда как чувствительные нейроны IV слоя чаще подвергаются хроматолизу, и именно в этом слое зарегистрирован наибольший процент нейронов с тотальным хроматолизом, также свидетельствующим о необратимом повреждении нейронов (табл. 1). На ультраструктурном уровне деструктивные изменения нейронов сопровождались разрушением цистерн гранулярного ЭПР, накоплением в клетках продуктов деградации мембранных структур в виде отложения гранул липофусцина, выявлялись митохондрии с деструкцией крист и появлением в матриксе электронно-плотного содержимого (рис. 2).

Подсчет удельной площади органелл в цитоплазме нейронов IV слоя коры головного мозга исследованных животных показал, что у крыс OXYS контрольной группы снижена по сравне-

нию с крысами Вистар удельная площадь гранулярного ЭПР в 2.3 раза, митохондрий – в 1.9 раза, а удельная площадь лизосом и вакуолей при этом увеличена в 10 и 4.6 раза соответственно ($p < 0.05$; табл. 2).

Клетки глии активно включаются как в процессы обеспечения жизнедеятельности, так и гибели нейронов. Во всех исследованных слоях коры головного мозга крыс OXYS были выявлены признаки активации глии, на которое указывало увеличение глиейронального индекса – соотношения клеток глии и нейронов ($p < 0.05$; табл. 1). Это было обусловлено главным образом увеличением численной плотности глии, поскольку значимых различий в плотности нейронов в коре крыс OXYS и Вистар выявлено не было. Наряду с увеличением плотности глии, в коре мозга крыс OXYS возрастает процент деструктивно измененных глиоцитов ($p < 0.05$; табл. 1).

Выявленные нами патологические изменения в коре мозга крыс OXYS развивались на фоне значительных нарушений в церебральных сосудах. Наряду с открытыми функционирующими сосудами с небольшим количеством форменных элементов в просвете, в коре мозга крыс OXYS присутство-

Таблица 1. IQ-1S подавляет деструктивные изменения нейронов и глии сенсомоторной области коры головного мозга крыс OXYS

Показатель		Вистар	OXYS	OXYS + IQ-1S
Гиперхромные сморщенные нейроны, %	II слой	0	4.00 ± 0.30*	1.3 ± 0.44*+
	IV слой	0	1.60 ± 0.51*	0.20 ± 0.20
	V слой	0	4.6 ± 1.02*	1.20 ± 0.37*+
Гиперхромные нейроны без сморщивания, %	II слой	4 ± 1.10	26.4 ± 1.50*	18 ± 2.07*+
	IV слой	3.8 ± 0.66	12 ± 3.65*	8.8 ± 0.86*
	V слой	2.4 ± 1.03	19.4 ± 2.66*	10.4 ± 1.96*+
Нейроны с очаговым хроматолизом, %	II слой	5.6 ± 1.50	12.6 ± 3.50*	8 ± 1.14
	IV слой	12.8 ± 2.69	23.4 ± 3.23*	6.6 ± 1.63+
	V слой	11.2 ± 3.22	26.4 ± 6.05*	19.4 ± 1.08+
Нейроны с тотальным хроматолизом, %	II слой	2.6 ± 1.03	5.4 ± 1.81	4.2 ± 1.07
	IV слой	2 ± 0.71	10.6 ± 2.44*	6 ± 0.95*+
	V слой	2.2 ± 0.86	7 ± 1.05*	3.8 ± 0.86+
Пикнотичные перинейральные глиоциты, %	II слой	4.2 ± 0.80	18.8 ± 2.63*	9.4 ± 2.32*+
	IV слой	3.4 ± 0.51	12.2 ± 1.59*	7.8 ± 0.86*+
	V слой	3 ± 1.00	7.6 ± 2.06	6.8 ± 1.24
Отечные перинейральные глиоциты, %	II слой	5.6 ± 0.87	37 ± 3.41*	23.6 ± 3.63*+
	IV слой	7 ± 2.19	35.6 ± 5.22*	18.8 ± 2.82*+
	V слой	4.8 ± 0.58	45.6 ± 1.91*	23.6 ± 1.86*+
Численная плотность нейронов в 1 мм ² среза	II слой	2187 ± 107	1854 ± 205	1955 ± 115
	IV слой	2516 ± 208	1751 ± 179	1825 ± 148
	V слой	1605 ± 89	1150 ± 119	1461 ± 159
Численная плотность перинейральной глии в 1 мм ² среза	II слой	327 ± 25	398 ± 20	331 ± 40
	IV слой	346 ± 12	370 ± 22	339 ± 21
	V слой	237 ± 14	256 ± 18	296 ± 31
Глионейрональный индекс	II слой	0.15 ± 0.02	0.23 ± 0.032*	0.18 ± 0.03
	IV слой	0.14 ± 0.02	0.22 ± 0.03*	0.19 ± 0.2
	V слой	0.15 ± 0.01	0.23 ± 0.03*	0.23 ± 0.06*

Данные представлены как $M \pm SEM$ ($n = 10$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

Таблица 2. Влияние IQ-1S на удельную площадь органелл в цитоплазме нейронов IV слоя сенсомоторной области коры головного мозга крыс OXYS (по данным электронной микроскопии)

Показатель	Вистар	OXYS	OXYS + IQ-1S
Гранулярный ЭПР, %	47.19 ± 2.54	20.87 ± 4.98*	33.7 ± 4.45*+
Митохондрии, %	14.79 ± 1.86	7.92 ± 1.83	11.48 ± 1.59
Лизосомы, %	1.33 ± 0.20	13.32 ± 0.88*	7.70 ± 1.20*+
Комплекс Гольджи, %	2.53 ± 0.45	1.55 ± 0.27	2.10 ± 0.21
Вакуоли, %	1.89 ± 0.44	8.77 ± 0.62*	6.56 ± 1.20*

Данные представлены как $M \pm SEM$ ($n = 10$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

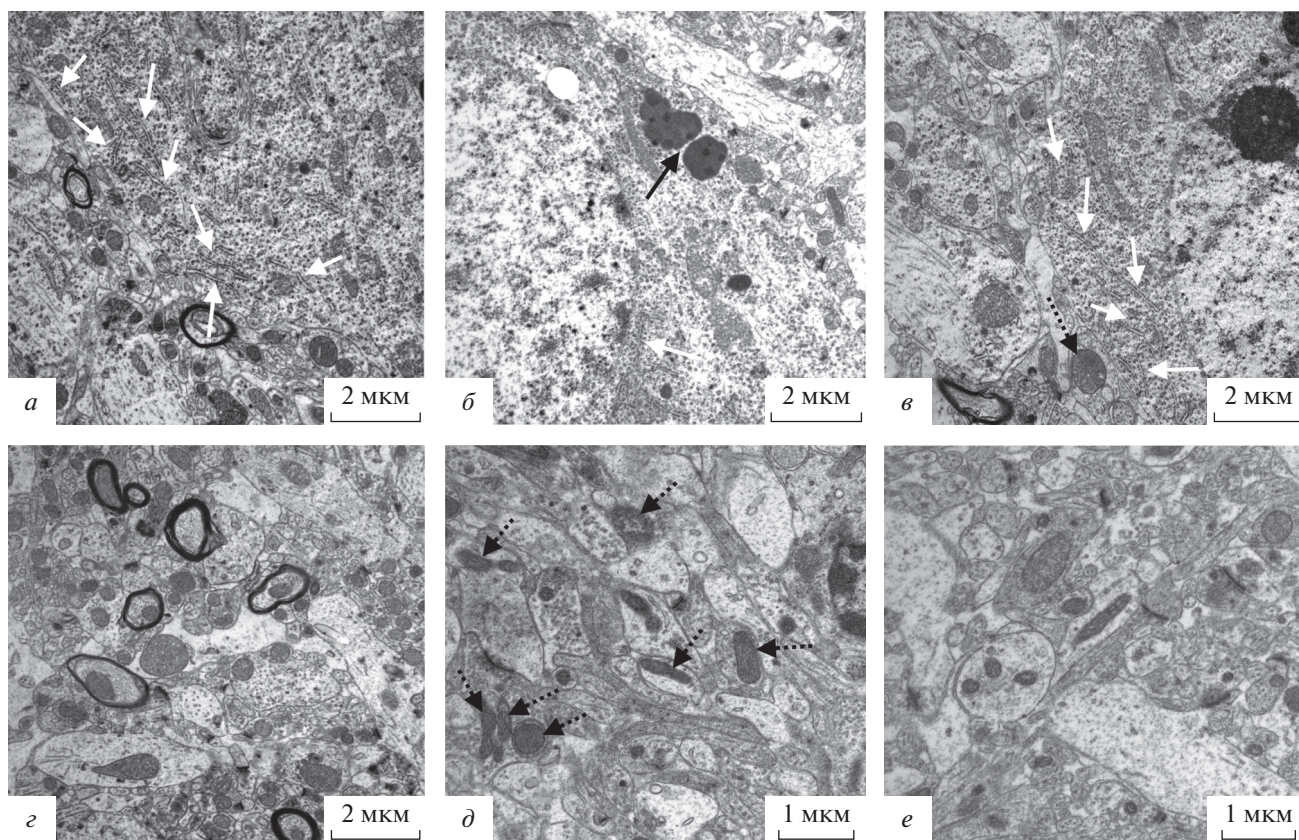


Рис. 2. Тела нейронов (*a, б, в*) и нейропил (*г, д, е*) IV слоя коры больших полушарий крыс Вистар (*a, г*), контрольных крыс OXY (*б, д*) и крыс OXY, получавших IQ-1S (*в, е*). Исчезновение цистерн гранулярного ЭПР на большом участке цитоплазмы нейрона контрольной крысы OXY, накопление в ней гранул липофусцина (черная стрелка), появление деструктивно измененных митохондрий с деструкцией матрикса и крист (пунктирные стрелки) в отростках. На фоне приема IQ-1S изменения структуры нейронов менее выражены – гранулярный ЭПР (белые стрелки) и митохондрии в основном имеют нормальное строение.

вали капилляры с признаками частичной окклюзии, свидетельствующие о нарушениях кровотока: с агрегацией форменных элементов крови, стазом и тромбозом мелких сосудов (рис. 3). В результате показатель удельной площади открытых функционирующих сосудов у контрольных крыс OXY оказался в 3 раза меньше, чем у крыс Вистар ($p < 0.001$; рис. 3).

IQ-1S при курсовом введении значительно улучшил состояние микроциркуляции в коре мозга животных, о чем свидетельствует увеличение вдвое удельной площади открытых функционирующих сосудов и снижение удельной площади сосудов с признаками частичной окклюзии в 2.3 раза по сравнению с выявленными у контрольных крыс OXY (рис. 3г). Можно полагать, что с влиянием IQ-1S на микроциркуляцию было связано увеличение сохранности нейронов в мозге животных. IQ-1S существенно улучшил общую картину сенсомоторной коры мозга крыс OXY (рис. 1в, е). У крыс OXY, получавших IQ-1S, доля нейронов с признаками деструктивных изменений снизилась во всех исследованных слоях коры мозга,

однако значений, характерных для крыс Вистар, достигал только показатель процентного содержания нейронов с очаговым хроматолизом (табл. 1). Исследование ультраструктуры нейронов показало, что прием IQ-1S в значительной степени предупредил деструкцию гранулярного ЭПР и митохондрий, дегенеративные изменения последних наблюдались гораздо реже. По сравнению с контролем в опытной группе крыс OXY происходило значимое увеличение удельной площади гранулярной ЭПР и снижение удельной площади лизосом, однако они не достигли значений, выявленных у крыс Вистар. На долю площади, занимаемой в нейронах митохондриями и вакуолями, IQ-1S значимо не повлиял (табл. 2).

IQ-1S при курсовом введении существенно уменьшал деструктивные изменения клеток глии в коре мозга крыс OXY и нормализовал глионейрональный индекс (табл. 1). Количественно мы оценили только перинейрональные глиоциты, находящиеся в тесном контакте с нейронами. На качественном уровне с помощью электронной микроскопии была проведена оценка всех типов

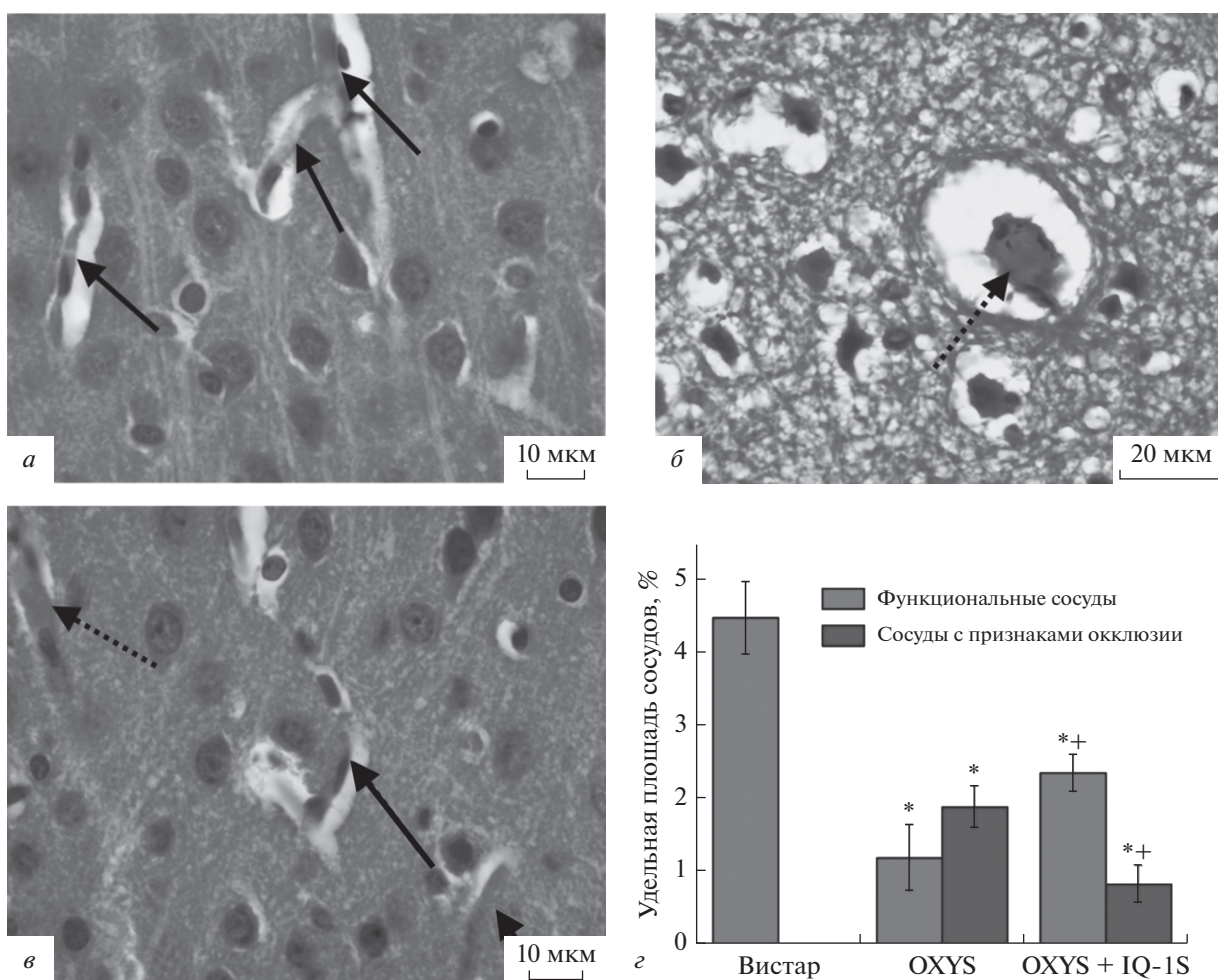


Рис. 3. Влияние IQ-1S на церебральные сосуды крыс OXYS. Репрезентативные фотографии сосудов крыс Вистар (а), OXYS (б) и крыс OXYS, получавших IQ-1S (в). Капилляры у крыс Вистар обычной структуры и кровенаполнения (черные стрелки), тромбоз капилляра с деструкцией эндотелиоцитов, отеком периваскулярного пространства у крысы OXYS (пунктирная стрелка). Прием IQ-1S снижает степень микроциркуляторных нарушений у крыс OXYS. Окраска крезидовым фиолетовым по Нисслю. z – удельная площадь церебральных сосудов. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 10$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

глиальных клеток. При этом в коре мозга контрольных крыс OXYS обращала на себя внимание активация клеток микроглии, накопление в их цитоплазме фагосом (рис. 4). В коре мозга крыс OXYS, получавших IQ-1S, признаки активации микроглии встречались намного реже.

IQ-1S улучшает реологические свойства крови. У крыс OXYS вязкость крови превышала значения данного показателя у крыс Вистар в диапазоне средних ($45\text{--}90\text{ с}^{-1}$) и высоких ($150\text{--}450\text{ с}^{-1}$) скоростей сдвига на $8\text{--}12\%$ (рис. 5). К факторам, определяющим вязкость крови, относятся гематокрит, вязкость плазмы (макрореологические показатели), а также агрегация эритроцитов и их деформируемость (микрореологические показатели) [24]. Вязкость плазмы и гематокрит у крыс Вистар и контрольных крыс OXYS не различались,

но при этом индекс деформируемости эритроцитов у крыс OXYS в диапазоне напряжений сдвига $7\text{--}20\text{ Па}$ был достоверно на $8\text{--}11\%$ ниже, чем у крыс Вистар (табл. 3). Наблюдаемые изменения гемореологических параметров в целом совпадают с ранее полученными данными [16] и свидетельствуют о развитии у крыс OXYS синдрома повышенной вязкости крови, приводящем к снижению эффективности транспорта кислорода кровью. IQ-1S у крыс OXYS не влиял на гематокрит, но при этом снижал содержание фибриногена в плазме крови крыс OXYS на 22% , что отразилось в уменьшении вязкости плазмы на 5% (табл. 3). IQ-1S вызывал увеличение индекса деформируемости эритроцитов относительно контроля на $17\text{--}20\%$ (табл. 3), снижал вязкость крови на $11\text{--}15\%$ во всем измеренном диапазоне скоростей сдвига и

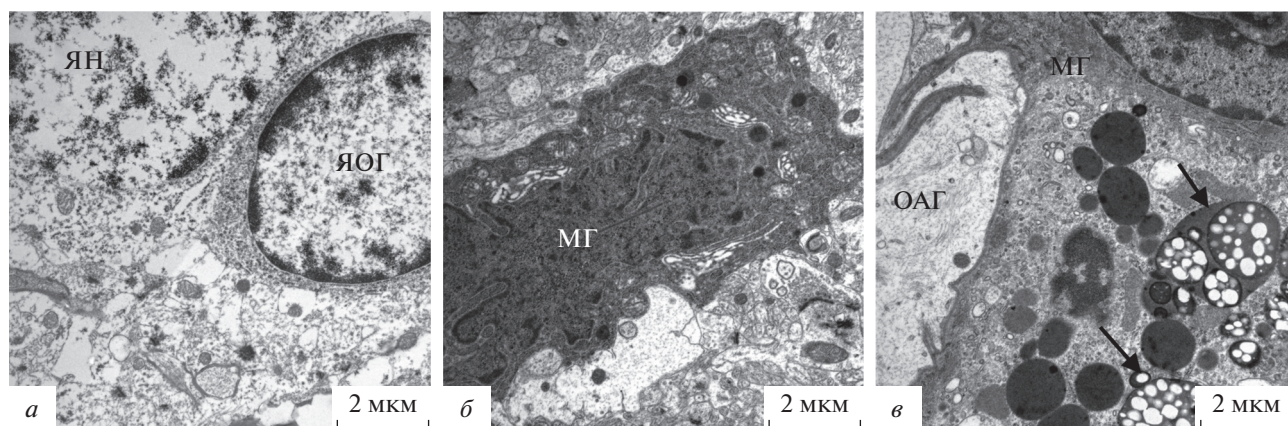


Рис. 4. Примеры изменений клеток глии в коре головного мозга 6-месячных крыс OXYS. *a* – внедрение олигодендрокита в цитоплазму деструктивно измененного нейрона. (ЯОГ – ядро олигодендрокита, ЯН – ядро нейрона). *б* – активированная клетка микроглии (МГ). *в* – фагосомы в цитоплазме клетки микроглии (ОАГ – отросток астроцита).

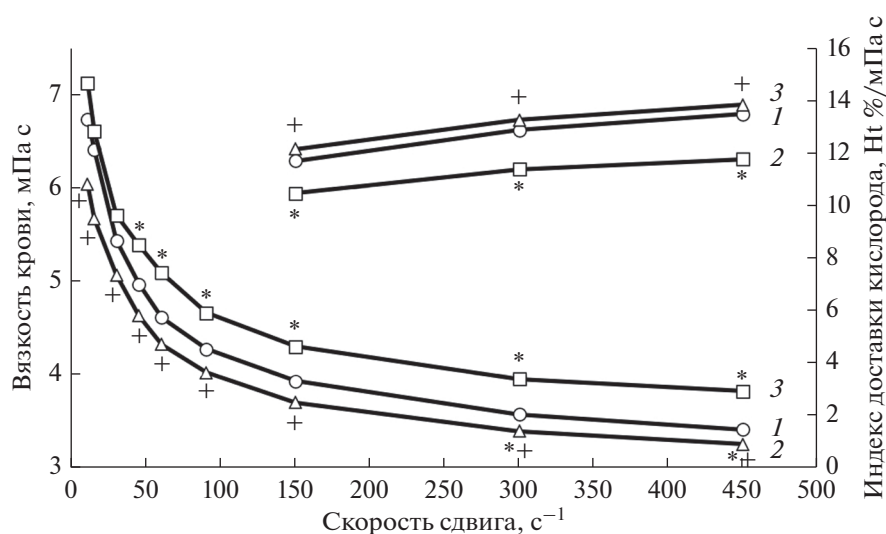


Рис. 5. Влияние IQ-1S на вязкость цельной крови крыс OXYS. 1 – крысы Вистар, 2 – контрольные крысы OXYS, 3 – крысы OXYS, получавшие IQ-1S. Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

повышал индекс доставки кислорода тканям на 12–17% (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной целью настоящего исследования была оценка профилактического потенциала IQ-1S – нового ингибитора JNK, проявляющего повышенный аффинитет к JNK3, его способности подавлять нейродегенеративные процессы у крыс OXYS на ранней стадии развития признаков БА. Уже в возрасте 3–4 мес. у крыс OXYS выявляются признаки нейродегенеративных изменений: гибель нейронов, синаптическая дисфункция, ги-

перфосфорилирование тау-белка и митохондриальная дисфункция, которые в совокупности приводят к поведенческим изменениям и ухудшению памяти [14, 25]. В то же время накопление амилоида бета происходит позже, чем эти проявления ускоренного старения мозга крыс OXYS, выраженное его увеличение регистрируется в коре мозга и гиппокампе животных в возрасте около 12 мес. [13]. Таким образом, на момент начала эксперимента у крыс OXYS уже присутствовали соответствующие патоморфологические признаки заболевания, а возраст с 4.5 до 6 мес., в течение которого крысы OXYS получали ингибитор JNK3 IQ-1S, может быть условно определен как про-

Таблица 3. Влияние IQ-1S на вязкость плазмы (ВП, мПа с), гематокрит (Ht, %), концентрацию фибриногена в плазме крови (ФГ, г/л) и индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ, отн. ед. при напряжении сдвига 7, 10 и 20 Па) у крыс OXYS

Группа	ВП	Ht	ФГ	ИДЭ		
				7 Па	10 Па	20 Па
Вистар	1.13 ± 0.01	46 ± 1	2.12 ± 0.19	0.393 ± 0.008	0.435 ± 0.005	0.473 ± 0.005
OXYS	1.16 ± 0.01	45 ± 1	2.17 ± 0.17	0.360 ± 0.009*	0.395 ± 0.008*	0.419 ± 0.005*
OXYS + IQ-1S	1.10 ± 0.01 ⁺	45 ± 1	1.71 ± 0.05 ⁺	0.434 ± 0.002* ⁺	0.463 ± 0.004* ⁺	0.496 ± 0.006* ⁺

Данные представлены как $M \pm SEM$ ($n = 5$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), ⁺ по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

дромальный период развития признаков БА [26]. Результаты настоящего исследования согласуются с полученными ранее данными. В сенсомоторной коре мозга 6-месячных крыс OXYS мы выявили выраженные нейродегенеративные изменения: усиленную гибель нейронов и признаки активации глии на фоне цереброваскулярных нарушений; нарушения микровакуляризации и микроциркуляции (уменьшение плотности кровеносных сосудов и появление значительного количества микрососудов с признаками частичной окклюзии). В расстройстве микроциркуляции вносят вклад нарушения реологических свойств крови: снижение деформируемости эритроцитов, возрастание вязкости плазмы, что в итоге проявляется возрастанием вязкости цельной крови и уменьшением доставки кислорода тканям. Наблюдаемые расстройства реологических свойств крови, микроциркуляции и микровакуляризации в ткани головного мозга крыс OXYS могут приводить к снижению кровотока, к несоответствию между потребностью мозга в кислороде и метаболических субстратах и их поступлением и, как следствие, к дисфункции нейронов [27].

Наши исследования показали, что IQ-1S при курсовом введении в течение полутора мес. ограничил развитие нейродегенеративных процессов в коре мозга крыс OXYS: увеличил долю неизменных нейронов и снизил долю нейронов с признаками деструкции и необратимых повреждений. При этом удельное количество нейронов в коре крыс Вистар и OXYS не различалось. Используемый нами метод не позволяет строго определить механизмы гибели нейронов. В то же время, достоверное уменьшение доли необратимо поврежденных нейронов (гиперхромных нейронов со сморщиванием и нейронов с признаками тотального хроматолиза) свидетельствует о том, что

IQ-1S подавлял гибель нейронов в сенсомоторной коре крыс OXYS [28]. Ранее [29] в префронтальной коре крыс OXYS возрасте 20 дней (на до-симптомной стадии) была выявлена активация апоптоза, которую авторы связали с задержкой созревания головного мозга в OXYS. Также они показали, что прогрессия БА-подобной патологии у крыс OXYS сопровождается активацией как апоптоза, так и некроптоза на фоне угнетения аутофагии и нарушения протеостаза.

Митохондриальная дисфункция считается наиболее вероятной причиной преждевременного старения крыс OXYS. Структурно-функциональные изменения митохондрий в мозге крыс OXYS предшествуют и сопутствуют развитию признаков БА, а воздействия, направленные на восстановление функций митохондрий, подавляют и/или задерживают их развитие [30, 31]. В настоящем исследовании мы выявили в нейронах сенсомоторной коры мозга крыс OXYS существенные нарушения ультраструктуры митохондрий и значительное уменьшение их количества, по сравнению с крысами Вистар. IQ-1S существенно улучшил ультраструктуру митохондрий, но значительно не повлиял на их количество. Также в значительной степени он предупредил деструкцию гранулярного ЭПР и активацию лизосомального аппарата.

В последние годы растет количество аргументов в пользу того, что в патогенезе спорадической формы БА значительную роль играют нарастающие с возрастом изменения глии [32]. Активация глии может предотвращать прогрессию БА, обеспечивая клиренс амилоида бета, в то же время чрезмерная активация глии усиливает его образование и экспрессию провоспалительных цитокинов в головном мозге [33]. Ранее было показано, что у крыс OXYS признаки БА развиваются в условиях снижения интенсивности нейрогенеза в

нейрогенной нише гиппокампа на фоне пониженной плотности астроцитов – при недостаточной глиальной поддержке нейронов, в то время как прогрессия заболевания протекает на фоне реактивного астроглиоза и активации микроглии в гиппокампе [34]. В настоящем исследовании мы не выявили увеличение численной плотности глиоцитов в сенсомоторной коре мозга 6-месячных крыс OXYS, но соотношение клеток глии и нейронов (глионейральный индекс) было повышено, по сравнению с крысами Вистар, во всех исследованных слоях коры, что указывает на активацию глии. При этом на электронномикроскопическом уровне зачастую наблюдались явления фагоцитоза нейронов олигодендроцитами, появление большого количества активированных микроглиоцитов с многочисленными вакуолями и фагосомами в цитоплазме. Как известно, активация микроглии является общим патолофизиологическим механизмом развития нейродегенеративных заболеваний и часто происходит параллельно или предшествует активной гибели нейронов [35]. На фоне приема IQ-1S в двух из трех исследованных слоев сенсомоторной коры крыс OXYS глионейральный индекс нормализовался, микроглия становилась менее активной. Ранее были выявлены снижение плотности кровеносных сосудов и их ультраструктурные аномалии в гиппокампе 5-месячных крыс OXYS в период активного проявления признаков БА и значительные цереброваскулярные нарушения – при их прогрессии [15]. Результаты нашего исследования подтвердили, что нарушения церебрального кровотока вносят существенный вклад в развитие нейродегенеративных процессов у крыс OXYS. Также мы показали, что нейропротекторный эффект IQ-1S в значительной степени обусловлен существенным улучшением микроциркуляции в коре мозга животных, о чем свидетельствовало увеличение вдвое доли открытых функционирующих сосудов. Очевидно, что на снабжение клеток мозга кислородом у крыс, получавших IQ-1S, позитивно повлияло и ослабление синдрома повышенной вязкости крови за счет улучшения деформируемости эритроцитов, снижения содержания фибриногена и уменьшения вязкости плазмы.

Таким образом, IQ-1S проявил способность улучшать отдельные макро- и микрореологические показатели и снижать таким образом выраженность синдрома повышенной вязкости крови у крыс OXYS. Подобные эффекты IQ-1S ранее продемонстрированы нами на моделях артериальной гипертензии и тотальной транзиторной ишемии головного мозга [36, 37]. Можно предположить, что улучшение реологических свойств крови способно вносить свой вклад в нейропро-

текторный эффект IQ-1S у крыс OXYS. В то же время, очевидно, что эффекты этого ингибитора JNK были системными.

JNK3, ключевая изоформа с-Jun N-терминальной киназы в ЦНС, участвует в развитии мозга, в реализации функций нейронов и реакциях на стрессы, является регулятором сигналов апоптоза [3]. Как отмечалось выше, с чрезмерной активацией JNK3 связывают гибель нейронов при БА, влияет она и на накопление бета амилоида и гиперфосфорилирование тау [4–6]. В то же время нет данных об изменении уровня и активности JNK3 в мозге с возрастом. Ограничением нашего исследования явилось отсутствие оценки как уровня самой JNK3, так и каких-либо ее мишеней, активности JNK-сигнального пути в коре мозга животных и влияния на них IQ-1S. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что увеличение активности сигнального пути JNK вносит вклад в развитие БА, в том числе на ранних стадиях ее развития. Мы полагаем, что применение ингибитора JNK3 IQ-1S может стать перспективной стратегией для профилактики ранних нейродегенеративных нарушений и, возможно, лечения БА. Однако для этого необходимо провести детальное изучение механизмов действия IQ-1S.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам ЦКП “Генофонды лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН за любезно предоставленных животных и сотрудникам лаборатории фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ О.И. Алиеву, А.М. Анищенко и А.В. Сидехменовой за помощь в проведении гемореологических исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование финансировалось Российским научным фондом, грант № 22-25-00686.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Исследование проводилось в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского совета от 22 сентября 2010 г. и было одобрено Комиссией по биоэтике СибГМУ (Протокол № 4 008/04/06/2022 от 20.06.2022). Томск, Россия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fazio S., Pace D., Maslow K., Zimmerman S., Kallmyer B. // *Gerontologist*. 2018. V. 58. P. 1–9.
2. Cummings J., Lee G., Ritter A., Zhong K. // *Alzheimers Dement.* (NY). 2018. V. 201. P. 195–214.
3. de Los Reyes Corrales T., Losada-Pérez M., Casas-Tintó S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1–12.
4. Yoon S.O., Park D.J., Ryu J.C., Ozer H.G., Tep C., Shin Y.J., Lim T.H., Pastorino L., Kunwar A.J., Walton J.C., Nagahara A.H., Lu K.P., Nelson R.J., Tuszyński M.H., Huang, K. // *Neuron*. 2012. V. 75. P. 824–837.
5. Yarza R., Vela S., Solas M., Ramirez M.J. // *Front Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 1–12.
6. Qin P., Ran Y., Liu Y., Wei C., Luan X., Niu H., Peng J., Sun J., Wu J. // *Bioorg. Chem.* 2022. V. 128. P. 1–13.
7. Gourmaud S., Paquet C., Dumurgier J., Pace C., Bouras C., Gray F., Laplanche J.L., Meurs E.F., Mouton-Liger F., Hugon J. // *J. Psychiatry Neurosci.* 2015. V. 40. P. 151–161.
8. Jun J., Baek J., Yang S., Moon H., Kim H., Cho H., Hah J.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1–17.
9. Jun J., Yang S., Lee J., Moon H., Kim J., Jung H., Im D., Oh Y., Jang M., Cho H., Baek J., Kim H., Kang D., Bae H., Tak C., Hwang K., Kwon H., Hah J.M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2023. V. 245. P. 1–16.
10. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Khlebnikov A.I., Hanks T.S., Kochetkova I., Pascual D.W., Jutila M.A., Quinn M.T. // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 8. P. 832–845.
11. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Hammaker D., Kochetkova I., Khlebnikov A.I., Lyakhov S.A., Firestein G.S., Quinn M.T. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015. V. 353. P. 505–516.
12. Schepetkin I.A., Khlebnikov A.I., Potapov A.S., Kovrizhina A.R., Matveevskaya V.V., Belyanin M.L., Atochin D.N., Zanoza S.O., Gaidarzhly N.M., Lyakhov S.A., Kirpotina L.N., Quinn M.T. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 161. P. 179–191.
13. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Korbolina E.E., Kiseleva E., Maksimova K.Y., Kolosova N.G. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. P. 1396–1413.
14. Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., Korbolina E.E., Muraleva N.A., Kolosova N.G. // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. P. 898–909.
15. Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. // *BMC Genomics*. 2018. V. 19. P. 51–63.
16. Maslov M.Y., Chernysheva G.A., Smol'jakova V.I., Aliev O.I., Kolosova N.G., Plotnikov M.B. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015. V. 60. P. 405–411.
17. Eisenmenger L.B., Peret A., Famakin B.M., Spahic A., Roberts G.S., Bockholt J.H., Johnson K.M., Paulsen J.S. // *Transl. Res.* 2022. V. 22. P. 41–53.
18. Zhdankina A.A., Tikhonov D.I., Logvinov S.V., Plotnikov M.B., Khlebnikov A.I., Kolosova N.G. // *Biomedicines*. 2023. V. 11. P. 1–16.
19. Kolosova N.G., Stefanova N.A., Korbolina E.E., Fursova A., Kozhevnikova O.S. // *Adv. Gerontol.* 2014. V. 27. P. 336–340.
20. Taylor C.R., Rudbeck L. // *Corporation D. Immunohistochemical staining methods*. Sixth edition. ed. Denmark: DAKO Corporation. 2013. P. 1–216.
21. Paxinos G., Watson C. // *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Compact seventh edition. ed. London, United Kingdom; San Diego, C.A.: Elsevier Academic Press. 2018. P. 1–462.
22. Stoltz J.F., Donner M. // *Schweiz. Med. Wochenschr. Suppl.* 1991. V. 43. P. 41–49.
23. Ishida K., Shimizu H., Hida H., Urakawa S., Ida K., Nishino H. // *Neuroscience*. 2004. V. 125. P. 633–644.
24. Alexy T., Detterich J., Connes P., Toth K., Nader E., Kenyeres P., Arriola-Montenegro J., Ulker P., Simmonds M.J. // *Front. Physiol.* 2022. V. 13. P. 1–15.
25. Rudnitskaya E.A., Maksimova K.Y., Muraleva N.A., Logvinov S.V., Yanshole L.V., Kolosova N.G., Stefanova N.A. // *Biogerontology*. 2015. V. 16. P. 303–316.
26. Kolosova N.G., Tyumentsev M.A., Muraleva N.A., Kiseleva E., Vitovtov A.O., Stefanova N.A. // *Curr. Alzheimer Res.* 2017. V. 14. P. 1283–1292.
27. Testud B., Delacour C., El Ahmadi A.A., Brun G., Girard N., Duhamel G., Heesen C., Häußler V., Thaler C., Has Silemek A.C., Stellmann J. P. // *Eur. J. Neurol.* 2022. V. 29. P. 1741–1752.
28. Groves M.J., Scaravilli F. // *Peripheral Neuropathy*. 2005. P. 683–732.
29. Telegina D.V., Suvorov G.K., Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1–17.
30. Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Kiseleva E.V., Kolosova N.G. // *Biochemistry*. 2018. V. 83. P. 1083–1088.
31. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Kiseleva E., Telegina D.V., Kolosova N.G. // *Aging (Albany NY)*. 2016. V. 8. P. 2713–2733.
32. Salas I.H., Burgado J., Allen N.J. // *Neurobiol. Dis.* 2020. V. 143. P. 1–12.
33. Huffers C.M., Middeldorp J., Hol E.M. // *Neurochem. Res.* 2022. P. 1–21.
34. Rudnitskaya E.A., Burnyasheva A.O., Kozlova T.A., Peunov D.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 1–20.
35. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. // *Science*. 2005. V. 308. P. 1314–1318.
36. Plotnikov M.B., Chernysheva G.A., Aliev O.I., Smol'jakova V.I., Fomina T.I., Osipenko A.N., Rydchenko V.S., Anfinogenova Y.J., Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Atochin D.N. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1–23.
37. Plotnikov M.B., Aliev O.I., Shamanaev A.Y., Sidekhenova A.V., Anishchenko A.M., Fomina T.I., Rydchenko V.S., Khlebnikov A.I., Anfinogenova Y.J., Schepetkin I.A., Atochin D.N. // *Hypertens. Res.* 2020. V. 43. P. 1068–1078.

JNK (c-Jun N-Terminal Kinase) Inhibitor IQ-1S Suppresses Premature Aging of OXYS Rat Brain

A. A. Zhdankina^a, A. N. Osipenko^a, D. I. Tikhonov^a, S. V. Logvinov^a,
M. B. Plotnikov^b, A. I. Khlebnikov^c, and N. G. Kolosova^d

^a Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

^b Department of Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia

^c Kizhner Research Center, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

^d Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

According to the international organization Alzheimer's Disease International (ADI), about 50 million people in the world suffer from Alzheimer's disease (AD). However, there are no effective methods for preventing and slowing down the progression of AD. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway is being discussed as an alternative way to prevent the development of AD and other neurodegenerative diseases. In the present study, we evaluated the ability of a recently synthesized selective JNK3 inhibitor, 11*H*-indeno[1,2-*b*]quinoxalin-11-on oxime sodium (IQ-1S), to suppress neurodegenerative processes in OXYS rats at an early stage of development of signs of AD at the age of 4, 5 to 6 months. Treatment with IQ-1S (50 mg/kg intragastrically) led to the suppression of the development of neurodegenerative processes in the cerebral cortex of OXYS rats: an increase in the proportion of unchanged neurons, a decrease in the proportion of neurons with signs of destruction and irreversible damage, and a normalization of the glioneuronal index, which was facilitated by a decrease in the severity of hyperviscosity syndrome blood in OXYS rats. The use of the JNK3 inhibitor IQ-1S may be a promising strategy for the prevention of early neurodegenerative disorders and, possibly, the treatment of AD.

Keywords: brain aging, neurodegeneration, OXYS rats, JNK inhibitor, 11*H*-indeno[1,2-*b*]quinoxalin-11-on oxime sodium, hemorheology