

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**ЕНГАЛЫЧЕВА МАРИЯ ГЕРМАНОВНА**

**АКТИВНОСТЬ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ И УРОВЕНЬ  
КАРБОНИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И  
ДЕМЕНЦИИ СОСУДИСТОГО ГЕНЕЗА**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

к.м.н., доцент Короткова Наталья Васильевна

Научный консультант:

д.м.н., доцент Петров Дмитрий Сергеевич

Рязань - 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1 Участие катепсинов в патогенезе болезни Альцгеймера.....	13
1.2 Вклад окислительного стресса в развитие болезни Альцгеймера .....	18
1.3 Эндогенная интоксикация при нейродегенеративных заболеваниях.....	23
1.4 Современные представления о патогенезе болезни Альцгеймера .....	25
1.5. Деменция сосудистого генеза: причины, отличия от болезни Альцгеймера, биохимические изменения .....	30
1.6 Взаимосвязь изменения активности катепсинов, окислительного стресса и эндогенной интоксикации в патогенезе болезни Альцгеймера .....	33
1.7 Роль лейкоцитов в патогенезе болезни Альцгеймера .....	35
1.7.1 Участие моноцитарных лейкоцитов в патогенезе болезни Альцгеймера	36
1.7.2 Вклад полиморфноядерных лейкоцитов в развитие болезни Альцгеймера .....	41
1.8 Заключение по разделу .....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	47
2.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование.....	47
2.2 Получение материала для исследования .....	51
2.2.1 Забор и подготовка проб крови .....	51
2.2.2 Выделение фракций лейкоцитов .....	51
2.2.3 Получение гомогенатов лейкоцитов.....	52
2.2.4 Определение содержания белка в плазме крови .....	52
2.2.5 Определение содержания белка в гомогенатах лейкоцитов .....	53
2.3 Определение активности катепсинов.....	54
2.4 Оценка содержания продуктов окислительной модификации белка .....	55
2.4.1 Оценка спонтанной окислительной модификации белка.....	56
2.4.2 Оценка металл-катализируемой (индуцированной) окислительной модификации белка.....	57
2.4.3 Оценка резервно-адаптационного потенциала .....	57
2.5 Определение уровня веществ низкой и средней молекулярной массы .....	58
2.6 Методы статистической обработки полученных результатов.....	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	60

3.1	Определение активности катепсинов плазмы крови и лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера и деменцией сосудистого генеза.....	60
3.1.1	Изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в плазме крови.....	60
3.1.2	Активность цистеиновых катепсинов в лейкоцитах.....	62
3.1.3	Динамика изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ с течением болезни Альцгеймера.....	64
3.2	Определение уровня окислительной модификации белков в плазме и лейкоцитах при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза.....	68
3.2.1	Уровень окислительной модификации белков плазмы крови.....	68
3.2.2	Уровень окислительной модификации белков полиморфноядерных лейкоцитов.....	71
3.2.3	Уровень окислительной модификации белков моноядерных лейкоцитов.....	72
3.2.4	Оценка резервно-адаптационного потенциала.....	74
3.2.5	Оценка уровня окислительной модификации белков в динамике болезни Альцгеймера.....	76
3.2.6	Взаимосвязь уровня окислительной модификации белков и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза.....	82
3.3	Оценка степени выраженности эндогенной интоксикации при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза.....	88
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	96
	ВЫВОДЫ.....	100
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	102
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	103
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	104
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Нейроны – уникальные клетки, обладающие рядом метаболических особенностей. Корректное функционирование лизосом является одним из важнейших условий утилизации различных продуктов жизнедеятельности клетки, поскольку нейроны не способны снижать содержание накопленных в ходе метаболизма токсичных молекул и агрегатов путем разрушения клеток. Резерв антиоксидантных возможностей клеток головного мозга ограничен, поэтому развитие окислительного стресса наблюдается при различных патологиях нервной системы [2, 92, 106].

Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний во всем мире. К моменту постановки диагноза в головном мозге происходят значительные патологические изменения, приводящие к развитию деменции. Однако отклонения на молекулярном уровне возникают за 5-10 лет до первых клинических проявлений заболевания, поэтому наиболее раннее их обнаружение позволило бы своевременно ставить диагноз и начинать лечение, что улучшило бы прогноз и качество жизни пациентов. Кроме того, выявление биохимических механизмов болезни необходимо для построения единой концепции патогенеза, динамического наблюдения за состоянием больного и поиска эффективных медикаментозных средств лечения [131, 143, 255].

Второй по частоте причиной слабоумия в старческом возрасте (после БА) является деменция сосудистой генеза (ДСГ). Важнейшим принципиальным патогенетическим отличием ДСГ от БА является отсутствие нейродегенеративных изменений в тканях головного мозга. Однако объединяет эти заболевания ряд схожих клинических проявлений, и некоторые метаболические отклонения (преобладание окислительного стресса над антиоксидантными возможностями нейронов, накопление токсических продуктов метаболизма в сверхвысоких концентрациях) [7, 28, 64].

В последние годы было предложено множество биохимических маркеров для диагностики БА (уровень амилоида  $\beta$ , тау-протеина, нейрофиламента F, нейрогранина, СС-хемокинового рецептора 2 моноцитов,  $\alpha$ -синуклеина и др.), но в большинстве случаев они проявляют ограниченную специфичность, их применение является инвазивным, поскольку требуется отбор спинномозговой жидкости. Поиск периферических маркеров БА (например, в плазме и форменных элементах крови) является актуальной проблемой современной биохимии [68, 177].

Клетки крови являются доступным материалом для лабораторной диагностики. Вовлеченность их в патологический процесс при БА не вызывает сомнения, учитывая интегральную роль кровообращения в организме. Ткани головного мозга несколько изолированы от системного кровотока за счет наличия гематоэнцефалического барьера, однако при БА его проницаемость существенно повышена, поэтому патологические процессы, происходящие в нейронах, коррелируют с изменениями метаболизма в периферических клетках крови [85, 104, 137].

### **Степень разработанности темы**

Доказано участие различных катепсинов в метаболизме таких нейрональных белков, как белок предшественник амилоида и тау-протеин, играющих ключевую роль в формировании амилоидных бляшек [165, 240, 246]. Катепсин В - один из ферментов, участвующих в регуляции количества  $A\beta$ -пептидов, однако нет единого понимания его роли в патогенезе нейродегенерации. С одной стороны, обладая  $\beta$ -секретазной активностью, он может участвовать в образовании  $A\beta$  пептидов, а с другой – участвовать в процессах их деградации [1, 222]. Сведений о вкладе в развитие болезни Альцгеймера других цистеиновых протеиназ (катепсинов L, H) в литературе практически не встречается. Активность же катепсинов в лейкоцитах при нейродегенеративных заболеваниях и деменции сосудистого генеза практически не изучалась.

Развитие окислительного стресса является неотъемлемым компонентом патогенеза болезни Альцгеймера [93, 107, 196, 213, 220, 228]. Причиной повышения уровня продуктов карбонилирования белков при БА является посттрансляционная окислительная модификация белков, и интенсивная протеолитическая деструкция. Итогом данных процессов является накопление белковых агрегатов, что приводит к нейрофибриллярной дегенерации нейронов. Окислительный стресс способствует превращению растворимых форм  $\beta$ -амилоидных пептидов в агрегированные структуры [103, 156, 252]. Ранее Дубининой Е.Е. с соавт. изучался уровень продуктов окислительной модификации белков плазмы крови пациентов с болезнью Альцгеймера [12, 41]. В современных библиографических источниках не встречается упоминаний об уровне окислительной модификации белков, а также взаимосвязи его с активностью лизосомальных протеаз, в клетках крови.

Развитие ОС наблюдается и при ДСГ, однако статистически достоверных отличий в уровне ОМБ плазмы крови по сравнению с БА в проведенных исследованиях выявлено не было [41, 42].

Накопление продуктов окислительной модификации макромолекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот), а также различных дериватов, образующихся в ходе нарушенного при нейродегенеративном процессе метаболизма, приводит к развитию синдрома эндогенной интоксикации [3, 46, 57, 67, 185]. Одним из показателей выраженности синдрома является уровень веществ низкой и средней молекулярной массы [18, 67]. Хотя этот показатель не является специфическим и строго патогномичным, определение его в комплексе с другими биохимическими маркерами позволяет сформировать представление о глубине нарушения метаболических процессов, а также выявить взаимосвязь между выраженностью оксидативного стресса и активностью протеиназ.

### **Цель исследования**

Изучить состояние системы лизосомальных цистеиновых протеиназ в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови во взаимосвязи с

карбонилированием белков и уровнем эндогенной интоксикации при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза.

Для осуществления цели поставлены следующие **задачи исследования:**

1. Изучить активность катепсинов Н, В, L в плазме и фракционированных лейкоцитах крови (полиморфноядерных, моноядерных) пациентов с болезнью Альцгеймера и деменцией сосудистого генеза.

2. Проанализировать зависимость изменения активности цистеиновых протеиназ от длительности болезни Альцгеймера.

3. Провести комплексную оценку содержания продуктов карбонилирования белков плазмы, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов крови и оценить резервно-адаптационный потенциал при деменции сосудистого генеза и в динамике болезни Альцгеймера.

4. Оценить уровень веществ средней и низкой молекулярной массы в плазме, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови при деменции сосудистого генеза и в динамике болезни Альцгеймера.

5. Проанализировать взаимосвязь состояния карбонилирования белков и лизосомального цистеинового протеолиза при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза.

### **Научная новизна**

Впервые исследована активность цистеиновых катепсинов полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера, а также пациентов с деменцией сосудистого генеза. Было выявлено, что БА ассоциирована с нарастанием активности цистеиновых катепсинов В, L, Н в плазме и моноядерных лейкоцитах, а также катепсинов В и Н в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови. Установлено, что активность катепсина L изменяется в динамике БА в моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитах. В ходе работы обнаружено, что активность катепсина L в плазме крови пациентов с деменцией сосудистого генеза выше, чем в группе сравнения и у пациентов с БА. Также течение деменции сосудистого

генеза сопровождается повышением активности катепсина В в обеих изучаемых фракциях лейкоцитов и активности катепсина L в полиморфноядерных лейкоцитах.

В ходе исследования впервые определено содержание карбонильных производных модифицированных белков во фракционированных лейкоцитах при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза. Обнаружено достоверное повышение уровня карбонильных производных в моноядерных лейкоцитах при БА, а также истощение резервно-адаптационного потенциала этих клеток. В этой же фракции лейкоцитов при БА обнаружено статистически достоверное повышение уровня веществ низкой и средней молекулярной массы. В лейкоцитах пациентов с ДСГ уровень накопления продуктов ОМБ и степень выраженности ЭИ статистически не отличается от аналогичных показателей в группе сравнения.

Отрицательная обратная связь средней силы была выявлена между уровнем окислительной модификации белков и активностью катепсина Н полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов у пациентов с БА.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Исследование носит преимущественно фундаментальный характер. Представленные в работе экспериментальные данные позволяют оценить метаболические изменения лейкоцитов периферической крови при БА и ДСГ (состояние активности цистеиновых протеиназ, уровень окислительной модификации белка, степень выраженности синдрома эндогенной интоксикации), что может быть учтено при разработке полимодальных диагностических панелей для прижизненной диагностики и мониторинга течения БА.

### **Методология и методы исследования**

Разделение крови на плазму и фракционированные лейкоциты производится методом изопикнического центрифугирования [18, 39]. Подсчет лейкоцитов осуществляется в камере Горяева с помощью бинокулярного микроскопа Р-15 «Биолам». Активность катепсинов В, L и Н изучается спектрофлуориметрическим



методом по Barrett и Kirschke [80]. Измерение содержания продуктов карбонилирования белков проводится по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой [41]. Комплексная оценка содержания продуктов карбонилирования белков осуществляется на основе авторской методики, разработанной на кафедре биологической химии РязГМУ (Пат. 2524667 РФ, МПК G01N 33/52 Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях / Фомина М.А. [и др.]; Ряз. гос. мед. ун-т им. И.П. Павлова. – 2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014, Бюл. № 21). Резервно-адаптационный потенциал оценивается расчетным способом по методу Никитиной Ю.В. [18]. Определение концентрации веществ низкой и средней молекулярной массы проводится по методике Копытовой Т.В. [18].

Полученные показатели рассчитывались на миллиграмм белка (в плазме крови измерение концентрации белка осуществлялось биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург, в гомогенатах клеток – по методу Лоури с помощью набора «Клини Тест-БЛ» «Эко Сервис», Россия).

Работа выполнена на базе кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО РязГМУ.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Активность цистеиновых катепсинов В, L, Н в плазме и моноядерных лейкоцитах, а также катепсинов В и Н в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови пациентов с болезнью Альцгеймера повышена по сравнению с аналогичными показателями у пациентов, не имеющих признаков нейродегенерации.

2. Активность катепсина L полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера изменяется в зависимости от длительности течения заболевания: у пациентов с длительностью заболевания 3-5 лет показатель выше, чем у пациентов с начальной (1-3 года) и поздней (5-10 лет) стадиями.

3. Суммарный уровень продуктов карбонилирования белков моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера превышает аналогичный показатель в группе сравнения; резервно-адаптационный потенциал плазмы крови, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера существенно снижен, причем с течением заболевания в большей степени истощается резервно-адаптационный потенциал плазмы.

4. Уровень веществ низкой и средней молекулярной массы моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера превышает аналогичный в группе сравнения, при этом в большей степени он повышен на ранних стадиях заболевания.

5. Между уровнем карбонильных производных модифицированных белков и активностью катепсина Н в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах при болезни Альцгеймера существует отрицательная обратная связь средней силы.

6. При деменции сосудистого генеза активность катепсина L в плазме крови и полиморфноядерных лейкоцитах, а также активность катепсина В в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови выше, чем у пациентов, не имеющих признаков деменции и нейродегенерации.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты, полученные в ходе исследования, доложены на конференциях:

1. Всероссийская научно-практическая конференция с Международным участием «Память, память будущего и сценарии жизни» 14-17 июня 2018, г. Рязань. Сорокина М.Г., Петров Д.С., Фомина М.А. «Болезнь Альцгеймера: проблемы диагностики и перспективы».
2. 11 Международная научно-практическая конференция «Достижения фундаментальных наук- основа формирования современной медицины» г. Астрахань, 12-14 сентября 2018, Сорокина М.Г. «Изменения активности

лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы и лейкоцитов крови как возможный маркер развития болезни Альцгеймера».

3. 25 Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины -2019» г. Санкт-Петербург, 28-29 марта 2019. Сорокина М.Г. «Состояние активности лизосомальных протеиназ лейкоцитов крови при болезни Альцгеймера».
4. XVII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета 10 октября 2019 года, г. Челябинск. Сорокина М.Г., Петров Д.С., Фомина М.А. «Окислительная модификация белков плазмы крови и лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера»
5. Ежегодная научная конференция Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. 20 декабря 2019 года, г. Рязань Енгальчева М.Г. «Эндогенная интоксикация и окислительная модификация белков плазмы крови и лейкоцитов при болезни Альцгеймера».
6. XXVI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблем биомедицины – 2020», 26-27 марта 2020. Енгальчева М.Г. «Комплексная оценка биохимических маркеров крови при болезни Альцгеймера».

### **Личный вклад автора**

Проведение информационного поиска по изучаемой проблеме, анализ источников литературы, проведение всех этапов лабораторных исследований, оформление первичной документации и статистическая обработка результатов выполнены лично автором или при его непосредственном участии. Разработка модели научного исследования, формулировка цели и задач, анализ, систематизация, статистическая обработка и представление основных результатов работы в научных публикациях проводились совместно с научным руководителем и научным консультантом.

### **Сведения о внедрении**

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедр биологической химии с курсом КЛД ФДПО, психиатрии и психотерапии ФДПО Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в практику Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая психиатрическая больница имени Н.Н. Баженова».

### **Объем и содержание работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Текст работы изложен на 135 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, проиллюстрирован 47 рисунками. Список литературы включает 261 источник: 67 отечественных и 194 зарубежных.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 работы в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, 1 из которых в издании, входящем в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus.

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.м.н. Коротковой Н.В., научному консультанту д.м.н. Петрову Д.С, а также д.м.н. Фоминой М.А. и проректору по научной и инновационной работе д.м.н. Сучкову И.А. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования, при подготовке и публикации печатных работ.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Участие катепсинов в патогенезе болезни Альцгеймера

Изменение проницаемости мембран лизосом, лизосомальная дисфункция и изменение активности лизосомальных протеаз играют важную роль в патогенезе многих заболеваний, в том числе нейродегенеративных (НДЗ), среди которых лидирующие позиции во всем мире занимает болезнь Альцгеймера (БА) [119, 165, 183, 210]. Корректное функционирование лизосом особенно важно для нейронов, поскольку они не могут снижать содержание накопленных в ходе метаболизма токсичных молекул и агрегатов путем разрушения клеток [2, 128, 168].

Нарушение баланса ферментативной активности протеаз является одним из первых молекулярных нарушений при старении и возрастных изменениях головного мозга. Однако при БА доказано участие различных катепсинов в метаболизме таких нейрональных белков, как белок предшественник амилоида (APP, amyloid precursor protein) и тау-протеин, играющих ключевую роль в формировании амилоидных бляшек [212, 240, 246].

Активность протеолитических ферментов представляют собой весьма чувствительный маркер клеточного «неблагополучия», а сведения об уровне активности протеаз могут быть использованы для изучения патогенетических механизмов, ранней диагностики, определения степени тяжести, поиска терапевтических мишеней при БА [2, 52, 62, 106, 184].

Катепсинами называют группу тканевых внутриклеточных протеолитических ферментов, расщепляющих в белках и пептидах пептидные связи. Большинство катепсинов локализовано в лизосомах, где созданы оптимальные условия для действия этих ферментов. Однако ряд протеаз способны выделяться из лизосом, выходить во внеклеточное пространство и подвергать протеолизу компоненты межклеточного матрикса [35, 63, 239, 247]. По строению активного центра катепсины делят на сериновые, цистеиновые, аспартатные (или карбоксильные) и металлопротеиназы [117, 119].

К настоящему времени установлено существование 11 цистеиновых катепсинов: В, С, L, F, Н, К, О, S, V, X и W. Некоторые из них (В, Н, L, С и О) распространены в клетках организма повсеместно, в том числе и в клетках головного мозга, что указывает на важную роль этих ферментов в общей деградации и обмене белка [184]. Другие катепсины, такие как F, К, S, V, X и W (лимфопаин), демонстрируют более ограниченное распределение в клетках и тканях, хотя все они, за исключением катепсина W, также были обнаружены в центральной нервной системе. Кроме того, известно, что иммунные клетки являются основным источником внеклеточных цистеиновых катепсинов при воспалении, в том числе в тканях головного мозга [178, 239].

Все цистеиновые катепсины имеют сходное строение, представляют собой мономерные белки массой около 30кДа. Ферменты состоят из двух доменов, в середине активного центра находятся два аминокислотных остатка (цистеин и гистидин), относящихся к разным доменам, которые формируют каталитический участок (рисунки 1, 2).

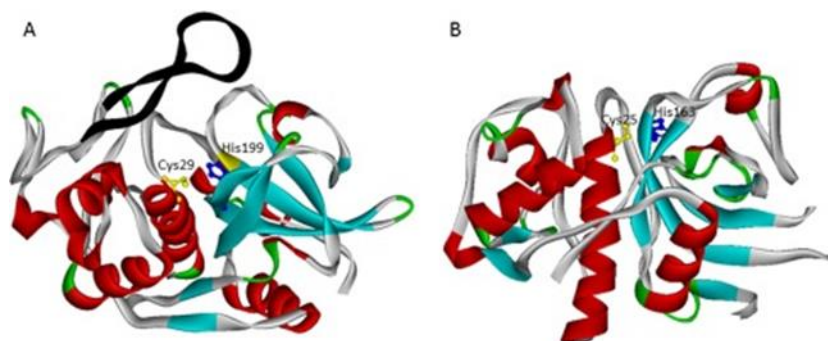


Рисунок 1 – Строение цистеиновых катепсинов,  
А – катепсин В; В – катепсин L (цит. по: Stoka V. et al., 2016)

Цистеиновые катепсины имеют широкую субстратную специфичность, предпочтительно расщепляя пептидные связи, образованные остатками основных и гидрофобных аминокислот. Большинство катепсинов преимущественно проявляют эндопептидазную активность, тогда как катепсины В, С, Н и X могут выступать и в качестве экзопептидаз. Суммарно лизосомальные катепсины представляют собой эффективный механизм для расщепления белков на более

мелкие фрагменты, в то время как дипептидазы и другие пептидазы завершают расщепление белков до свободных аминокислот [32, 222, 239].

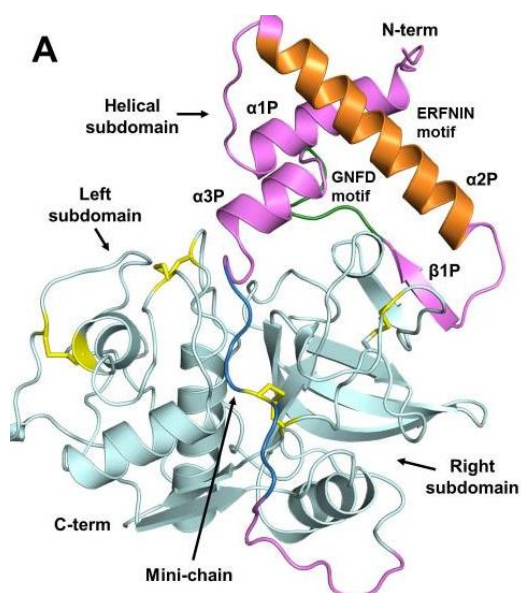


Рисунок 2 - Структура катепсина Н (цит. по: Нао Y. et al., 2018)

Излишняя активность катепсина может стать патологической, если она неконтролируема. В дополнение к локализации (автономное ограничение в лизосомах, где создается оптимальная для катепсинов кислая среда) их действие можно контролировать *in vivo* путем регулирования экспрессии соответствующих генов, посттрансляционных модификаций, изменением pH среды, воздействием эндогенных (например, цистатины) и экзогенных ингибиторов или комбинации всех этих факторов. Все лизосомальные катепсины синтезируются как неактивные препроэнзимы. После протеолитического удаления пропептида (отщепления N-концевого сигнального пептида в просвете эндоплазматического ретикулума и одновременного N-концевого гликозилирования проэнзима), который может проходить аутокаталитическим путем или опосредован другой протеазой, высвобождаются активные зрелые катепсины [32, 122].

Протеолитическая активность цистеиновых катепсинов контролируется эндогенными белковыми ингибиторами - цистатинами, функциональная активность которых снижена при нейродегенеративных процессах. Экзогенные

синтетические ингибиторы, которые могут увеличивать ингибирующий потенциал цистатинов, рассматриваются как возможные терапевтические инструменты для лечения неврологических расстройств [227].

При БА утечка катепсинов из лизосом усиливается из-за повышения проницаемости их мембран, в ответ на это активируются проапоптотические факторы, что способствует прогрессированию нейродегенерации (НД) [184, 224, 227]. Дополнительным источником катепсинов в головном мозге являются активированные клетки микроглии. Установлено, что активированная микроглия участвует в нейровоспалении, которое сопровождается многочисленными нейродегенеративными расстройствами, включая БА [36, 222].

Лизосомальные протеиназы играют ведущую роль в процессе деградации внутриклеточных структур – аутофагии. Эндолизосомальный протеолиз и аутофагия играют центральную роль в клиренсе различных клеточных макромолекул, белковых дериватов, что важно, учитывая дефицит клиренса амилоида- $\beta$  (А $\beta$ ) при БА [183]. К настоящему моменту известны три основных типа аутофагии: макроаутофагии, микроаутофагии и опосредованная шаперонами аутофагия. Однако все три пути сходятся на уровне лизосом, где происходит деградация органелл и биомолекул [222, 227]. Таким образом, нарушения процесса аутофагии, приводящее к накоплению аномальных белковых агрегатов, вносят значительный вклад в развитие нейродегенеративных заболеваний, в том числе при БА. Одной из возможных причин нарушения процесса аутофагии при БА, возможно, является дефицит протеолитической активности в лизосомах [49, 222].

Наиболее широко изучена роль катепсина В в патогенезе БА. Однако накопленные к настоящему времени сведения довольно противоречивы. Рядом исследований доказано, что катепсин В *in vivo* очень эффективен в деградации А $\beta$ . Путем генетической аблации цистатина С (ингибитора цистеиновых протеиназ), была доказана нейропротекторная роль катепсина [222, 227]. В другом исследовании было показано, что ингибирование катепсина В *in vivo* улучшает память и уменьшает А $\beta$  у трансгенных мышей с БА [244]. Кроме того,



катепсин В в секреторных везикулах был недавно идентифицирован как  $\beta$ -секретаза для продукции нейротоксических А $\beta$ , которые накапливаются при БА [119].

Кардинально противоположные результаты получены в исследовании Tonef et al. Помимо А $\beta$ , существуют пироглутамат-амилоид- $\beta$ -пептиды (pGlu-А $\beta$ ). Их считают особенно патогенными. Они представляют собой N-концевые усеченные участки А $\beta$ , в которых глутамат на N-конце циклизуется до пироглутамата. Выключение гена катепсина В уменьшало уровень pGlu-А $\beta$  (3-40/42). Сверхэкспрессия гена, напротив, увеличивала уровень pGlu-А $\beta$ . Лечение трансгенных мышей с БА с помощью E64d, ингибитора катепсина В, уменьшало уровень pGlu-А $\beta$ . Обработка нейрональных хромафинных клеток препаратом SA074Me, который также является ингибитором катепсина В, приводило к снижению pGlu-А $\beta$ . Одновременный нокаут гена и лечение E64d демонстрировало улучшение дефицита памяти у мышей [244].

В пользу патогенного влияния катепсинов В и L свидетельствует и снижение уровня А $\beta$  при применении ингибиторов этих катепсинов у животных [101, 217]. Кроме того, доказано, что специфическое ингибирование микроглиального катепсина В может привести к нейропротективным результатам при БА и у людей [212]. В исследовании Bai H. и соавторов доказана взаимосвязь повышения активности катепсина В и потенцирования окислительного стресса при БА через формирование инфламмасом [99].

Доказано, что сульфгидрильная группа цистеина (Cys32) катепсина В расщепляет А $\beta$ -пептид с карбоксильного конца в месте расположения остатка глутаминовой кислоты (Glu11), а снижение продукции и активности катепсина В инициирует накопление А $\beta$ -пептидов [122].

Также известно, что цистеиновые катепсины В и L участвуют в деградации не только амилоидных пептидов, но и C-концевых фрагментов APP и  $\beta$ -секретазы (BACE1, beta-site APP-cleaving enzyme 1), а также влияют на метаболизм холестерина в нейронах. Снижение активности данных катепсинов или их ингибирование ведет к лизосомальной недостаточности, нарушению синтеза

белков, участвующих в высвобождении холестерина, нарушению деградации ключевых белков БА [106].

В недавнем исследовании показано, что катепсин В может ускорить метаболизм А $\beta$ -пептидов через лизосомальные пути и уменьшить дефицит памяти, связанный с БА. Гиппокампальные инъекции аденоассоциированного вируса, продуцирующего катепсин В, уменьшали уровни А $\beta$ , увеличивали Lamp1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) и улучшали обучение и память у мышей [127].

Лизосомальные ферменты рассматривают как потенциальные маркеры в диагностике различных нейропатологий, в том числе БА [47, 170, 221, 241]. В спинномозговой жидкости (СМЖ) и мозге пациентов с БА был выявлен повышенный уровень катепсинов В и D [232].

Таким образом, APP является предметом обширной протеолитической обработки, поэтому теории о влиянии лизосомальных протеаз на возникновение БА, возможности диагностического исследования активности катепсинов в качестве маркера, применения их ингибиторов или индукторов в лечении заболевания требуют дальнейшего изучения [222]. Катепсин В – один из белков, участвующий в регуляции количества А $\beta$ -пептидов, однако нет единого понимания его роли в патогенезе БА. С одной стороны, обладая  $\beta$ -секретазной активностью, он может участвовать в образовании А $\beta$  пептидов, а с другой – участвовать в процессах их деградации [1].

## **1.2 Вклад окислительного стресса в развитие болезни Альцгеймера**

Развитие НД при БА неразрывно связано с активизацией свободнорадикальных процессов в головном мозге и развитием окислительного стресса (ОС) [92, 93, 95, 191, 213, 215, 237]. Потребление кислорода - необходимое условие для выживания клеток, особенно нейронов, которые абсолютно не устойчивы к гипоксии [25]. Однако потребление кислорода может вызвать дисфункцию клеток и их гибель из-за производства свободных радикалов

в митохондриях. НДЗ вызываются чрезмерным генерированием свободных радикалов в нейронах, что приводит к гибели нейрональных клеток при БА [231].

Активные формы кислорода (АФК) могут образовываться в организме неферментативно в результате химических, фотохимических реакций и реакций переноса электронов или в качестве побочных продуктов эндогенных ферментативных реакций, фагоцитоза и воспаления.

Дисбаланс в гомеостазе АФК, вызванный нарушениями в антиоксидантных ферментах или неферментативных антиоксидантных сетях, увеличивает ОС, приводя к патологическому окислению и химической модификации (перекисному окислению) биомакромолекул, таких как липиды, ДНК и белки [249]. ОС при БА способствует отложению А $\beta$ , гиперфосфорилированию тау-белка и последующей дегенерации синапсов и нейронов, что признано ключевыми патогенетическими звеньями заболевания (рисунок 3) [103, 107, 108, 215, 226].



Рисунок 3 - Взаимосвязь окислительного стресса и формирования амилоида и нейродегенерации при болезни Альцгеймера (модиф. из: Tonies E. et al., 2017)

Поскольку ОС является частью нормального старения, разница между БА и нормальным старением может быть вызвана различной способностью нейронов справляться с повышенной выработкой АФК. Доказано, что уровень антиоксидантной защиты в головном мозге пациентов с БА существенно снижен, что делает нейроны особенно чувствительными к нарушению баланса между антиоксидантами и выработкой АФК [72, 147, 160]. Кроме того, в тканях головного мозга пациентов с БА обнаружено повышение содержания тяжелых металлов: меди, железа, свинца, ртути, цинка. Ионы металлов выступают в роли мощных прооксидантов, взаимодействуют с APP и A $\beta$ , усиливают нейротоксичность [202, 236]. В свою очередь, присутствие A $\beta$  в головном мозге пациентов с БА потенцирует образование АФК. Так, A $\beta$  легко образует реакционно способный комплекс с ионами меди (Cu(I)-A $\beta$ , Cu(II)-A $\beta$ ), катализирующий образование перекиси водорода и гидроксильного радикала, которые в свою очередь повреждают белки, липиды, нуклеиновые кислоты (рисунок 4) [197]. Также A $\beta$  индуцирует активацию НАДФ-оксидазы в гиппокампе, что приводит к образованию пероксинитрита, мощного окислителя макромолекул. Опосредованное пероксинитритом нитрозилирование тирозина и цистеина чрезвычайно опасно, приводит к дисфункции белков и ферментов, что в конечном итоге приводит к гибели нейронов *in vitro* [84].

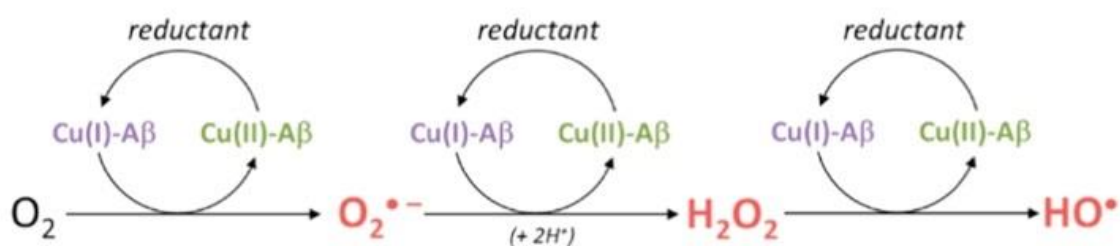


Рисунок 4 - Продукция АФК с участием амилоида  $\beta$  при болезни Альцгеймера (цит. по: Cheignon C. et al., 2018)

При БА формируется порочный круг: снижение синтеза АТФ (аденозинтрифосфата, основного коллектора энергии в клетке), преобладание

генерации АФК над их деградацией приводят к чрезмерной продукции А $\beta$ , что оказывает еще большее патологическое влияние на митохондрии, еще больше усугубляя нейродегенеративные процессы [202, 243, 260]. ОС провоцирует и гиперфосфорилирование тау-протеина, вероятно, за счет влияния на белки-ферменты – киназы и фосфатазы, участвующие в регуляции фосфорилирования [196, 204].

Развитие НД неразрывно связано с активизацией свободнорадикальных процессов в организме, при этом окислительная модификация белков (ОМБ) признана одним из наиболее ранних и стабильных маркеров поражения тканей при окислительном стрессе. Установлено, что продукты окисления белков (карбонильные производные) появляются в клетке раньше и являются более стойкими и удобными для определения, чем продукты перекисного окисления липидов [12, 103, 202, 213, 226].

Причиной повышения уровня ОМБ при БА является не только посттрансляционная окислительная модификация белков, но и интенсивная протеолитическая деструкция. Итогом данных процессов является накопление агрегатов окисленных белков, что в свою очередь приводит к нейрофибриллярной дегенерации нейронов головного мозга при БА. Кроме того, ОС способствует превращению растворимых форм  $\beta$ -амилоидных пептидов в агрегированные структуры [103, 108, 156].

Карбонильные производные были зарегистрированы в сенильных бляшках и нейрофибриллярных сплетениях аутопсийного материала пациентов с БА. В плазме крови больных БА также зарегистрирован более высокий уровень карбонильных производных белков по сравнению с пожилыми людьми того же возраста без признаков НД [89, 199, 226].

Олигомер А $\beta$  также, как и многие другие белки, подвергается окислительной модификации. Установлено несколько аминокислотных остатков, наиболее часто подвергающихся воздействию АФК. Это остатки гистидина, фенилаланина, тирозина, метионина, глутамина (рисунок 5). Окислительные модификации изменяют свойства А $\beta$ : увеличивается агрегационная способность,

отдельные олигопептиды приобретают реакционноспособные участки, легко взаимодействующие между собой [197].

Лабораторная диагностика БА сводится к определению различных метаболитов, свидетельствующих о степени выраженности ОС, в СМЖ и биоптатах головного мозга [1, 54]. Получение СМЖ и, особенно, прижизненных биоптатов тканей головного мозга, технически сложно осуществимые (в том числе из-за малой мобильности пациентов с БА) и экономически затратные процедуры.

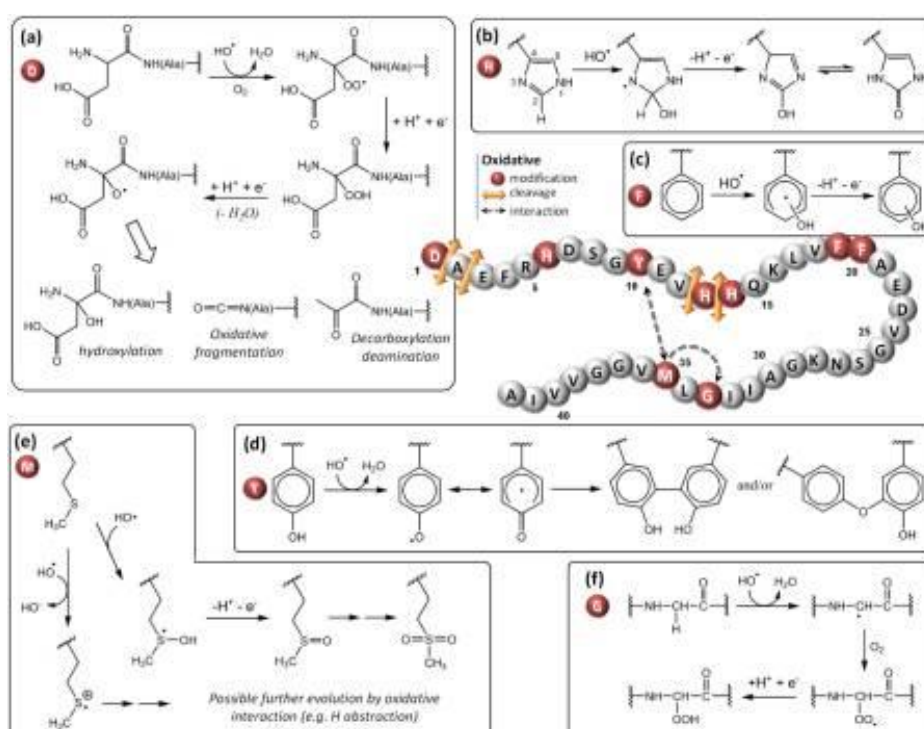


Рисунок 5 - Схема окислительных модификаций, которым подвергается амилоид  $\beta$  при болезни Альцгеймера (цит. по: Cheignon C. et al., 2018)

Риск, связанный с проведением процедуры, не оправдан диагностической ценностью информации, полученной таким способом. Поэтому активно ведется поиск периферических маркеров, легко доступных для прижизненной диагностики ранних стадий БА, но при этом не уступающих по информативности тканям головного мозга и СМЖ. Клетки крови являются одним из потенциальных периферических маркеров НДЗ [147, 201]. В лейкоцитах при БА изменена

активность таких ферментов антиоксидантной защиты, как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза [147, 150]. Vida et al. подтвердили, что в изолированных нейтрофилах при БА более высокое, по сравнению со здоровыми лицами, содержание окисленного глутатиона и малонового диальдегида (маркеров ОС) [72]. Таким образом, определение маркеров ОС в лейкоцитах крови можно считать показателем, отражающим степень активности свободнорадикальных процессов в головном мозге при БА, что важно для понимания патогенеза заболевания, диагностики и поиска терапевтических мишеней НДЗ.

### **1.3 Эндогенная интоксикация при нейродегенеративных заболеваниях**

Формирование НД при БА неразрывно связано с активизацией свободнорадикальных процессов в тканях головного мозга и развитием ОС [93, 108, 213]. При этом активизируются процессы перекисного окисления липидов [3, 67], окислительной модификации белков [67, 108, 260] и нуклеиновых кислот [164, 256]. Одним из проявлений ответа на повышенное образование продуктов окислительной модификации белков и их замедленную элиминацию может являться развитие синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ).

Основными условиями развития синдрома ЭИ являются: 1) преобладание катаболизма над анаболизмом, 2) нарушение активности белоксинтезирующих систем, 3) нарушение функций детоксикационных систем [67]. ЭИ – сложный патофизиологический процесс, характеризующийся накоплением в клетках и тканях организма различных соединений и метаболитов, в концентрациях, превышающих физиологические, или в формах, не свойственных биологическому виду. В качестве маркера наличия и степени выраженности эндогенной интоксикации в настоящее время используется определение концентрации веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) в различных биологических средах [18, 33, 67].

ВНиСММ представляют собой небелковые продукты массой от 300 до 6000 Да, образовавшиеся в ходе катаболизма различных соединений, в том числе подвергшихся ОС [46, 57, 67]. К ним относятся: 1) конечные продукты обмена (например, мочевины, креатинин и их дериваты), 2) промежуточные продукты метаболизма (метилксантин, 6-тиогуанин), накапливающиеся в повышенных концентрациях, 3) продукты свободнорадикального окисления, 4) метаболические продукты (фенол, скатол, кадаверин и др.). Эти вещества распределяются между белками-переносчиками плазмы, мицеллами липопротеинов, гликокаликсом эритроцитов, способными транспортировать эти вещества [18]. Таким образом, определение концентрации ВНиСММ в различных биологических средах является маркером выраженности ЭИ.

Узбеков М.Г. с соавторами предполагают, что ЭИ можно рассматривать в качестве интегрального компонента патогенеза многих психических патологий [21]. Многие компоненты ВНиСММ способны проявлять нейротоксическую активность. В физиологических условиях ткань головного мозга в некоторой степени защищена от токсического воздействия молекул средней массы, однако при БА существенно возрастает проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Проникая в центральную нервную систему (ЦНС), молекулы средней массы способны присоединяться к различным рецепторам, блокируя их или неадекватно изменяя метаболизм любой клетки. Являясь вторичными токсинами, ВНиСММ усугубляют течение патологического процесса: еще больше повышают проницаемость ГЭБ, нарушают работу микроциркуляторного русла, ингибируют митохондриальное окисление, нарушают процессы транспорта аминокислот, ионов калия и натрия в ЦНС, что связано с ингибированием  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы [46].

Степень выраженности ЭИ при БА изучена мало. В литературе встречается мало информации об уровне ВНиСММ в крови и лейкоцитах при БА. Однако ЭИ – процесс, неразрывно связанный с изменениями лизосомального протеолиза и нарастанием ОС, которые, без сомнений, наблюдаются при БА.



#### **1.4 Современные представления о патогенезе болезни Альцгеймера**

По данным Всемирной организации здравоохранения число больных деменцией неуклонно растет с каждым годом. Если в 2011 году число больных, страдающих деменцией, составляло 35,6млн, а в 2016 – 47,5млн, то к 2030 прогнозируется рост заболеваемости до 74,7млн, к 2050 – 115,4млн. Среди основных причин деменции БА занимает лидирующие позиции во всех странах мира, особенно среди пациентов старше 65-70 лет. БА является причиной 60-70% всех случаев деменции в мире [123, 143, 162, 172].

Несмотря на то, что впервые БА была описана еще в 1907 году, до сих пор не разработана единая концепция патогенеза заболевания, что создает ряд трудностей: не принят единый подход к ранней диагностике заболевания, отсутствуют эффективные методы своевременной профилактики и лечения заболевания. Доказано, что изменения на молекулярном уровне при нейродегенеративных заболеваниях возникают за 5-10 лет до первых клинических проявлений деменции [22, 24, 207, 255]. Поэтому поиск информативных биохимических маркеров в тканях, легко доступных для прижизненной диагностики, является актуальным и перспективным.

Не вызывает сомнения, что ключевую роль в инициации НД при БА играют экстрацеллюлярная агрегация  $A\beta$  и внутриклеточное накопление нейрофибриллярных клубков (NFT, neurofibrillary tangles), состоящих из гиперфосфорилированного тау-белка, в корковой и лимбической областях мозга человека (рисунок 6) [70, 114, 172].  $A\beta$  формируется из-за аномального процессинга APP  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретазами (гипотеза амилоидного каскада) [90, 144].

APP - трансмембранный белок нейронов, имеющий внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены, состоящий из 639-770 аминокислотных остатков. Ген, кодирующий белок, находится на 21 хромосоме, содержит 18 экзонов.

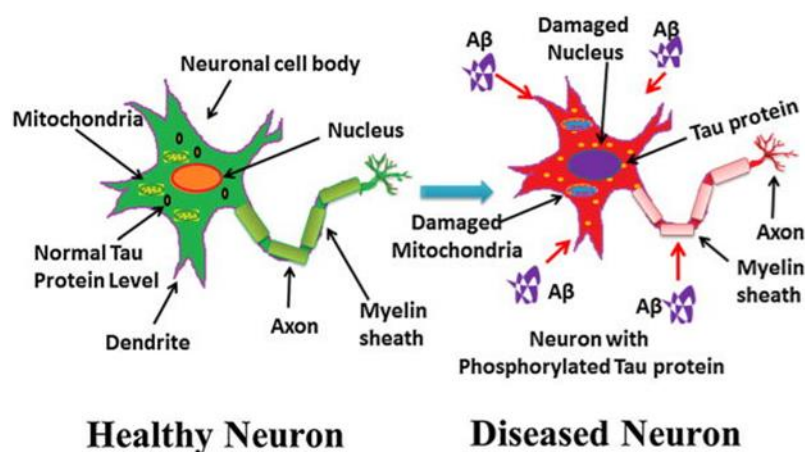


Рисунок 6 – Структурные отличия нейрона при болезни Альцгеймера от здорового нейрона (цит. по: Kamat P. et al., 2016)

Изначально APP синтезируется в виде незрелого предшественника с молекулярной массой 95кДа, в ходе посттрансляционной модификации, включающей гликозилирование, фосфорилирование, сиалирование и сульфатирование тирозина, формируется холопротеин с молекулярной массой 100-120кДа [121].

Внеклеточная часть белка намного крупнее, чем внутриклеточная, разделена на E1 и E2 домены, связанные кислотным доменом AcD (рисунок 7).

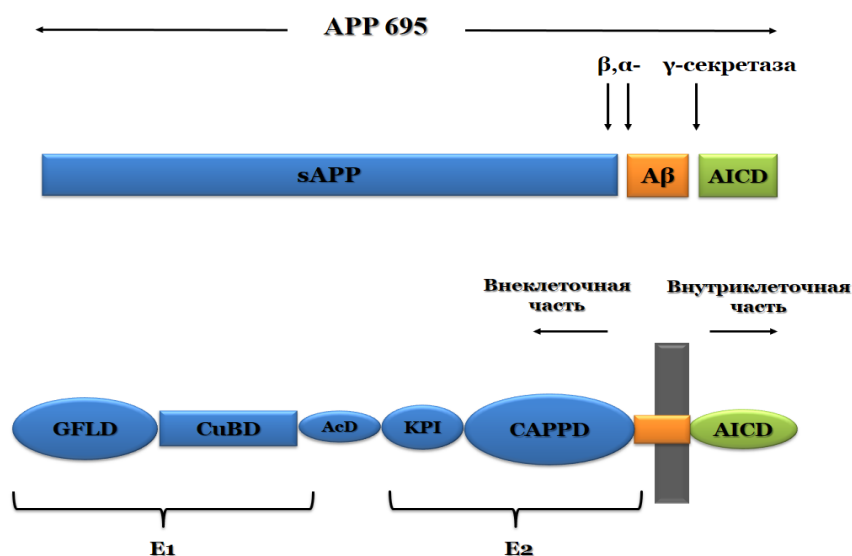


Рисунок 7 - Строение белка предшественника амилоида (APP)  
(модиф. из: Constanze R. et al, 2005)

Установлено, что E1 содержит два субдомена: домен, подобный фактору роста (GFLD), и домен, связывающий медь (CuBD). E2 домен, который называют также центральным (CAPPD), гликозилирован, содержит линкерный участок и контактирует с доменом ингибитора протеаз (КРІ) [115, 183].

Функциональная роль APP до конца не установлена, однако известно, что белок участвует в формировании и восстановлении синаптических связей во время дифференцировки нервных клеток-предшественников [76, 229]. Также APP принимает участие в быстром антероградном транспорте различных аминокислот совместно с белком кинезином [78]. APP обладает феррооксидазной активностью, сходной с церулоплазмином, облегчает экспорт железа из клетки. Однако при БА эта активность блокируется цинком [153].

APP может расщепляться протеазами семейства секретаз (рисунок 8). Если APP подвергается процессингу под действием  $\alpha$ - и  $\gamma$ -секретаз, образуются растворимые пептиды р3, при этом удаляется почти весь внеклеточный домен [259].

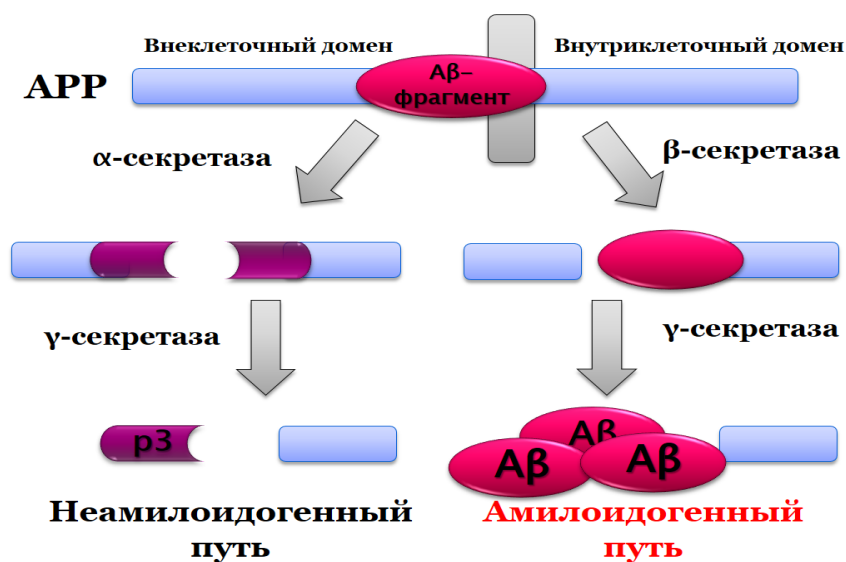


Рисунок 8 - Варианты протеолитического расщепления APP

(модиф. из: Zheng H. et al., 2006)

Если же протеолиз происходит под действием  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретаз, формируются олигопептиды, состоящие из 40-42 аминокислотных остатков ( $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ), которые образуют нерастворимые конгломераты, откладывающиеся в

экстрацеллюлярном пространстве и формирующие амилоидные бляшки. Наличие амилоидных бляшек приводит к активации микроглии, астроцитов, системы комплемента, что в конечном итоге запускает развитие нейровоспаления и НД [123, 159, 161].

Устойчивая, нерегулируемая продукция  $A\beta$ , генерирует состояние хронического воспаления, повышенную продукцию провоспалительных цитокинов, продукцию свободных радикалов, дисфункцию митохондрий, истощение микроглии, разрушение нейронов и некроз соседних клеток ткани [70, 138, 216], что в конечном итоге приводит к НД и развитию деменции. У здорового человека существует несколько систем элиминации патологического олигопептида  $A\beta$  (рисунок 9).

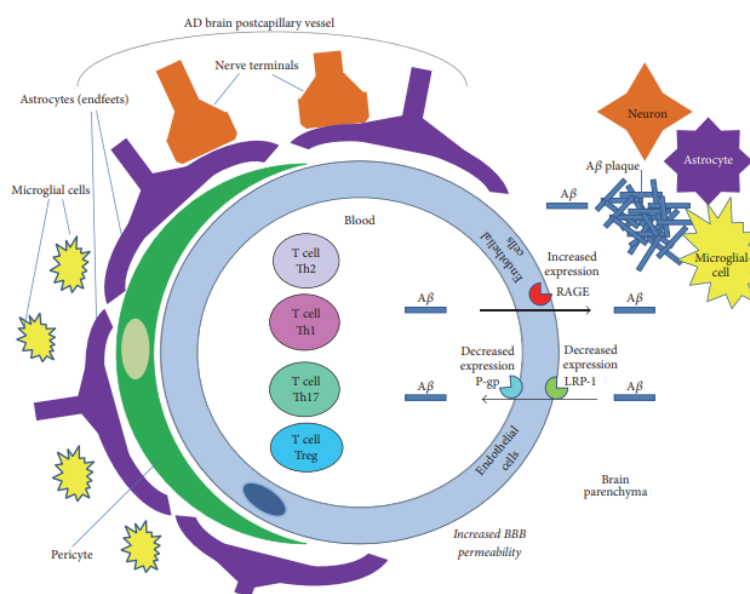


Рисунок 9 - Транспорт амилоида  $\beta$  через гематоэнцефалический барьер с помощью RAGE и LRP-1 (цит. по: Mietelska-Porowska A. et al., 2017)

Через LRP-1 (рецепторы липопротеинов низкой плотности) рецепторы при помощи гликопротеина Р  $A\beta$  перемещается через ГЭБ в кровь, где может быть утилизирован протеолитическими системами. Однако возможен и обратный транспорт из кровотока в головной мозг через RAGE (рецептор для перемещения продуктов гликозилирования) рецепторы. При БА наблюдается дисбаланс:

экспрессия RAGE возрастает, а гликопротеина Р и LRP-1 - снижается. В итоге А $\beta$  накапливается в тканях головного мозга [174]. Немаловажную роль в этом процессе играют лимфоциты.

Доказано, что при БА А $\beta$  может транспортироваться через эндотелиальные клетки ГЭБ, проницаемость которого существенно возрастает при НДЗ [84, 86, 87].

Помимо отложения амилоида, при БА происходит гиперфосфорилирование тау-протеина с формированием нейрофибриллярных клубков [90, 159, 161, 218]. Тау-протеин относится к семейству белков, ассоциированных с микротрубочками аксонов. Ген, кодирующий белок тау, находится в локусе 17q21, содержит 16 экзонов и может подвергаться альтернативному сплайсингу экзонов 2, 3 и 10 в мозге человека, генерируя 6 основных изоформ. Тау представляет собой фосфопротеин, содержащий 85 потенциальных сайтов фосфорилирования по остаткам серина и треонина. Связывающие домены белка имеют положительный заряд, что позволяет им связываться с отрицательно заряженными микротрубочками, стабилизируя их структуру [74, 163, 233].

Состояние фосфорилирования Тау находится под контролем многих тирозиназ и фосфатаз (рисунок 10). Главными регуляторными факторами является GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase, киназа синтазы гликогена 3) и CDK5 (cyclin dependent kinase, циклин-зависимая киназа 5) [73].

В результате гиперфосфорилирования Тау, нарушения структуры микротрубочек аксонов, происходит образование нейрофибриллярных клубков (NTF, neurofibrillary tangles).

NTF проявляют нейротоксические свойства, потенцирует патологические эффекты А $\beta$ : нарушается аксональный транспорт, синаптическая передача, целостность нуклеиновых кислот нейронов, усиливается ОС, что в конечном итоге приводит к НД [157, 163, 218, 233, 234].

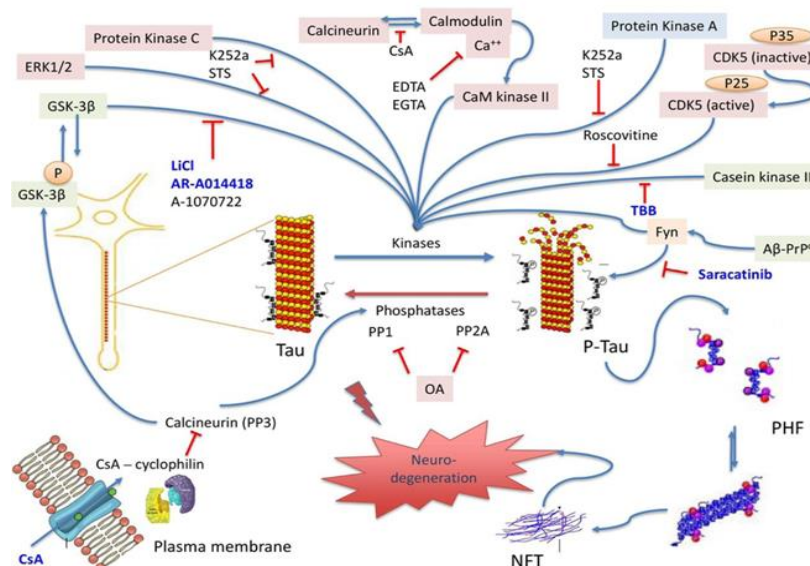


Рисунок 10 - Гиперфосфорилирование тау-протеина как одно из патогенетических звеньев в развитии нейродегенерации при болезни Альцгеймера (цит. по: Yadikar H. et al., 2019)

### 1.5. Деменция сосудистого генеза: причины, отличия от болезни Альцгеймера, биохимические изменения

ДСГ – второй по частоте подтип деменций после БА [7, 109, 135]. Клинически ДСГ может проявляться симптомами, сходными с БА: снижение когнитивных навыков, инертность психических процессов, брадифрения [7, 64]. В отличие от БА нарушения познавательных способностей появляются и прогрессируют довольно стремительно – после сосудистой катастрофы (ишемического или геморрагического инсульта) [28, 64].

Основной причиной ДСГ является гипоперфузия тканей головного мозга вследствие атеросклероза или спазма артерий, кровоснабжающих ЦНС (рисунок 11). Цереброваскулярные эндотелиальные клетки первыми оказываются в состоянии гипоперфузии. Возникающая при этом дисфункция эндотелия может привести ко многим последствиям: увеличение проницаемости ГЭБ, воздействие на нервные клетки вредных веществ, усиление воспалительных процессов, дисфункция нервно-сосудистых связей. Результатом всех этих патологических изменений является активация глиальных клеток в ЦНС, что приводит к

повреждению нейронов и постепенному развитию деменции [109, 126, 235, 257]. Помимо этого, при ДСГ имеет место микроциркуляторная ангиопатия, нарастание окислительного стресса, нейровоспаление, апоптоз [4, 145].

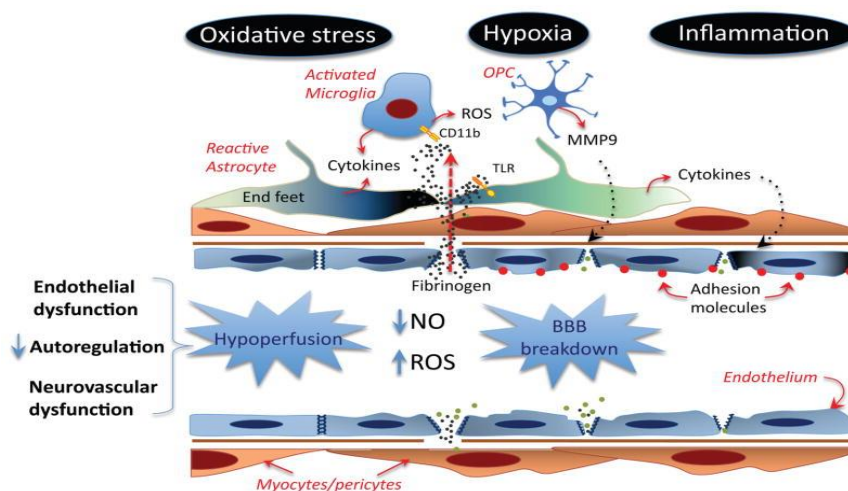


Рисунок 11 - Комплекс патологических процессов, происходящих при гипоперфузии тканей головного мозга (цит. по: Iadeloca C., 2013)

Исследования показали, что проницаемость ГЭБ увеличивалась и у пациентов с ДСГ, и с БА по сравнению с контрольной группой здоровых людей соответствующего возраста [6, 132].

Было признано, что воспаление играет решающую роль в патогенетических механизмах цереброваскулярных и НДЗ. Клинические и экспериментальные исследования подтверждают, что повреждение белого вещества при ДСГ является не просто следствием хронической кислородной недостаточности, но вызвано и поддерживается провоспалительной средой [150, 251].

Во время воспалительной реакции лейкоциты попадают из кровотока во внесосудистое пространство (рисунок 12). Активация эндотелиальных клеток приводит к экспрессии молекул адгезии на их поверхности, позволяя связываться с реципрокными молекулами на поверхности циркулирующих лейкоцитов. Активированные эндотелиальные клетки повышают экспрессию молекул адгезии, таких как ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, молекулы межклеточной

адгезии), VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1, молекулы сосудистой адгезии) и селектинов (P-, E-селектина) [109].

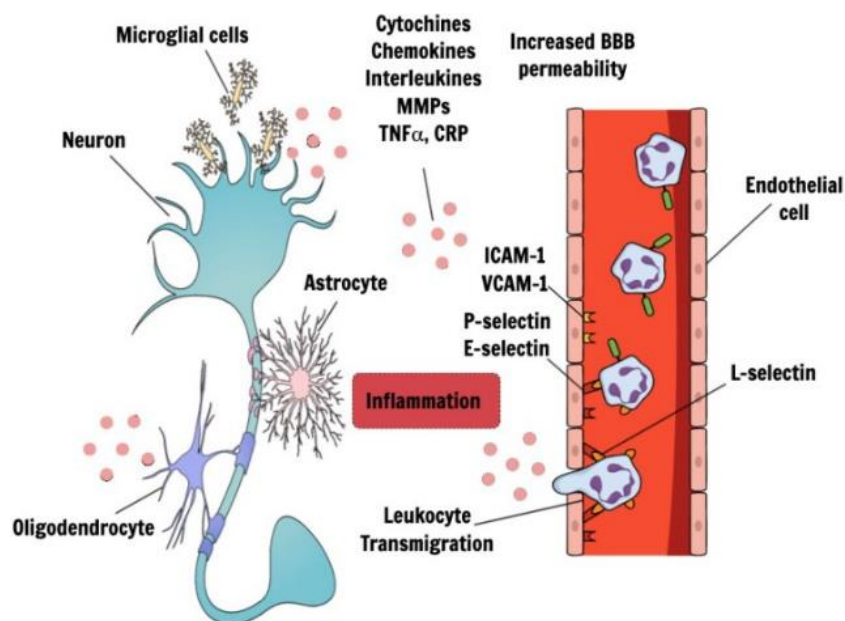


Рисунок 12 – Участие лейкоцитов в воспалительном процессе при деменции сосудистого генеза (цит. по: Chipollini P. et al., 2019)

Повышенная проницаемость ГЭБ приводит к проникновению воспалительных факторов (интерлейкинов, хемокинов, цитокинов) в мозг, что усугубляет повреждение белого вещества (демиелинизация, потеря аксонов, дегенерация олигодендроцитов), вызывает гибель клеток, а также усиливает нейроглиальное воспаление [109, 252].

Основными принципиальными отличиями ДСГ от БА являются отсутствие НД, отложения Аβ и формирования NTF. При ДСГ имеет место очаговая потеря нейронов, но связано это с процессами старения организма, усилением апоптоза, ОС в результате гипоперфузии тканей [26].

Маркеры ОС определяются в крови у пациентов с ДСГ. Так, например, у пациентов с ДСГ возрастает количество гидропероксидов, малонового диальдегида, изменяется уровень гомоцистеина [81, 82, 124, 140, 192]. Литературные данные об уровне ОМБ в крови при ДСГ немногочисленны.



Дубининой Е. Е. с соавт. было установлено, что в крови пациентов с ДСГ уровень металл-катализируемой ОМБ ниже, а активность супероксиддисмутазы выше, чем у пациентов без признаков деменции [125, 193]. В исследовании Polidori et al. было обнаружено повышение карбонильных производных белков и битирозина в плазме крови пациентов как с БА, так и с ДСГ [206]. Однако в литературе почти не встречается сведений об уровне ОМБ в клетках крови пациентов с ДСГ.

Вовлечение катепсинов в патогенез ДСГ изучено незначительно. В эксперименте было установлено, что в тканях гиппокампа мышей при моделировании у них ДСГ, возрастает активность катепсина В [237]. В лимфоцитах пациентов с ДСГ отмечается более высокая активность катепсина G (сериновая протеаза) по сравнению со здоровыми донорами [252].

### **1.6 Взаимосвязь изменения активности катепсинов, окислительного стресса и эндогенной интоксикации в патогенезе болезни Альцгеймера**

Лизосомальный протеолиз является одним из механизмов защиты организма от накопления продуктов ОМБ. В условиях развития ОС в организме лизосомы обеспечивают защитную функцию [50, 55]. Недостаточная активность лизосомальных протеаз ведет к избыточному накоплению продуктов окислительной деструкции протеинов, липидов, нуклеиновых кислот, что ведет к развитию синдрома ЭИ (рисунок13) [34, 40, 50]. Основными биохимическими механизмами, вносящими вклад в формирование ЭИ, считают: 1) активацию тканевого протеолиза; 2) активацию свободнорадикального окисления; 3) действие бактериальных токсинов [30].

Активация протеолиза - гидролитического расщепления белков под действием катепсинов, представляет собой один из наиболее общих молекулярных механизмов повреждения различных тканей в условиях патологии. Таким образом, формируется потенцирование и взаимозависящее усугубление трех патологических процессов: окислительного стресса, ЭИ и тканевого протеолиза [3].

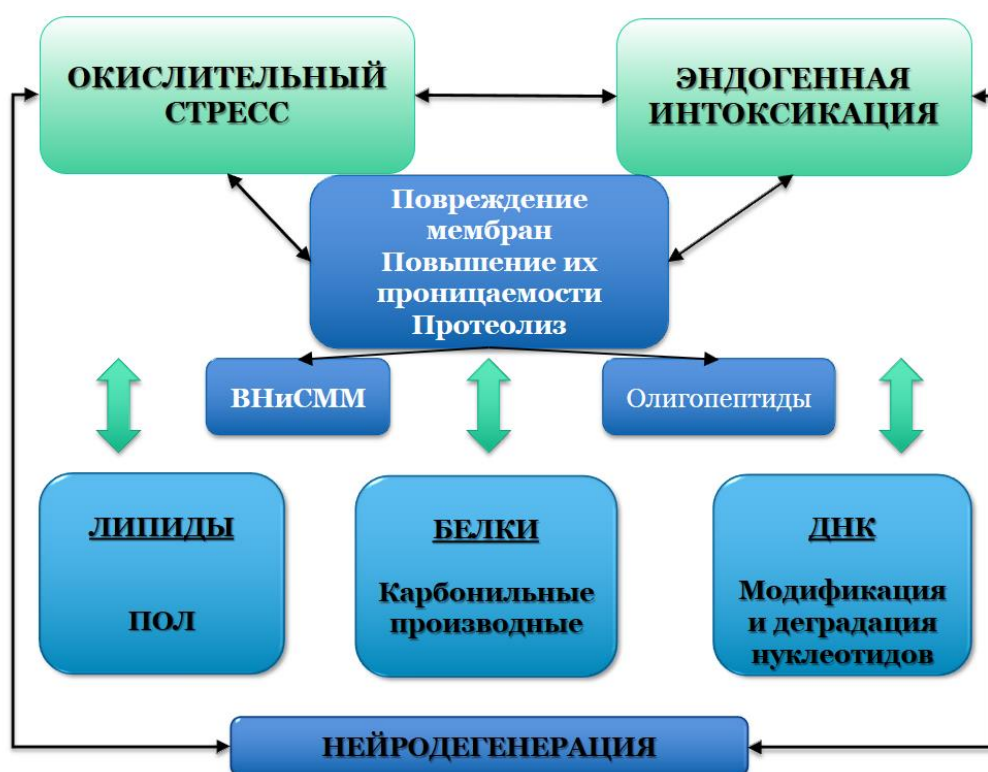


Рисунок 13 - Патогенетическая взаимосвязь окислительного стресса и синдрома эндогенной интоксикации при нейродегенеративных заболеваниях

Патогенетическая связь между ОС, протеолизом и ЭИ выявлена при многих патологиях: сосудистые нарушения [17], злокачественные новообразования [9], иммунологические нарушения [65], эндокринные заболевания [16].

Наличие в головном мозге отложений  $A\beta$  способствует повреждению митохондрий и нарастанию ОС, что провоцирует гиперфосфорилирование тау-протеина (рисунок 14). При БА формируется порочный круг: гиперфосфорилирование тау и отложение  $A\beta$  стимулирует активацию микроглии и астроцитов, которые выделяют цитокины и нейротоксичные воспалительные молекулы (интерлейкины, фактор некроза опухоли и др.), которые в свою очередь модифицируют активность тау-киназ, протеаз, участвующих в процессинге APP, тем самым усугубляя амилоидоз, формирование NTF и НД [79, 101, 163, 258].

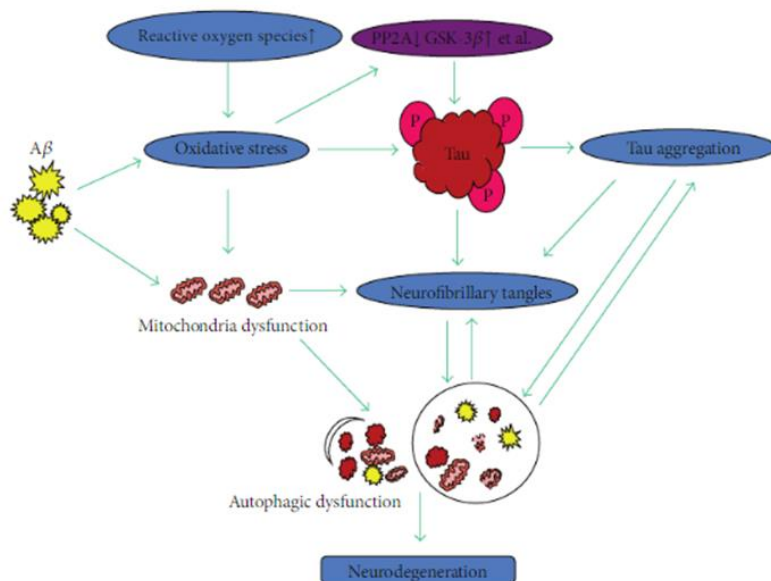


Рисунок 14 - Взаимосвязь амилоидогенеза, гиперфосфорилирования тау-протеина и окислительного стресса в патогенезе нейродегенерации  
(цит. по: Liu Z. et al., 2015)

### 1.7 Роль лейкоцитов в патогенезе болезни Альцгеймера

Ткани головного мозга отчасти изолированы от других органов за счет наличия ГЭБ. Однако кровь является интегральной средой, объединяющей все клетки организма в единое целое. Изменение метаболизма нейронов, патологические процессы, происходящие в ЦНС, сказываются на метаболизме клеток крови, циркулирующих в сосудах головного мозга. Попадая после этого в системный кровоток, клеточные элементы крови сохраняют ряд метаболических отклонений, которые могут иметь важную диагностическую ценность. Так, например, не вызывает сомнения, что при БА имеет место нарастание ОС в пораженных нейронах. При этом доказано, что изменения окислительных процессов возникают и во вненейрональных тканях: СМЖ, плазме, моче, эритроцитах, тромбоцитах, лимфоцитах, фибробластах. Определение степени выраженности окислительных процессов в периферических клетках пациентов с БА могут быть полезными в качестве диагностических маркеров, индикаторов прогрессирования заболевания, инструмента для разработки терапевтических

подходов и мониторинга терапевтической эффективности. Периферические клетки также полезны для обнаружения механизмов, лежащих в основе множественных изменений клеточных сигнальных путей, сопровождающих БА. Кроме того, кровь - легкодоступный для лабораторной диагностики материал, в отличие от тканей головного мозга [83, 136].

### **1.7.1 Участие моноцитарных лейкоцитов в патогенезе болезни Альцгеймера**

Имеются обширные доказательства того, что накопление моноклеарных фагоцитов, в том числе микроглиальных клеток, моноцитов и макрофагов в местах отложения  $A\beta$  в головном мозге, является важной патологической характеристикой БА, а концентрация этих клеток, сгруппированных вокруг амилоида, в несколько раз выше, чем в соседних областях мозга [120, 137]. Так как ГЭБ проницаем для моноядерных (МЯЛ) и полиморфноядерных лейкоцитов (пМЯЛ), можно предположить, что изменения метаболизма этих клеток могут косвенно указывать на патологические изменения в тканях головного мозга, а также являться периферическим маркером нейродегенеративного процесса.

Недавние исследования показывают, что основные биомаркеры БА могут быть обнаружены в форменных элементах крови. Появились сверхчувствительные анализы, которые позволяют количественно определять нейрональные белки, такие как тау - протеин и NTF, в образцах крови. Уровень  $A\beta$ , определяемый в плазме и клетках крови, коррелирует со степенью выраженности амилоидоза головного мозга, оцененным с помощью сканирования ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография). Ведутся разработки полимодальных диагностических панелей, в которых биомаркеры крови могут иметь значение в качестве инструментов скрининга, свидетельствующих о БА [8, 85, 86, 104, 118].

Клетки крови не только мигрируют в мозг, но и могут возвращаться в системный кровоток, создавая замкнутый круг между периферией и ЦНС (рисунок 15). Измененный ГЭБ облегчает рециркуляцию медиаторов воспаления, таких как цитокины, хемокины и продукты активации системы комплемента.

Соответственно, воспаление, которое может быть инициировано в мозге, может привести к высвобождению различных провоспалительных метаболитов (в том числе активных форм кислорода), которые мигрируют на периферию и воздействуют на периферические иммунные клетки, либо активируя их, либо привлекая их в головной мозг. Иммунные клетки, рекрутированные в поврежденный мозг, поддерживают нейровоспаление и НД. Этот порочный круг может либо способствовать разрешению воспалительного процесса, либо способствовать производству А $\beta$  [216].

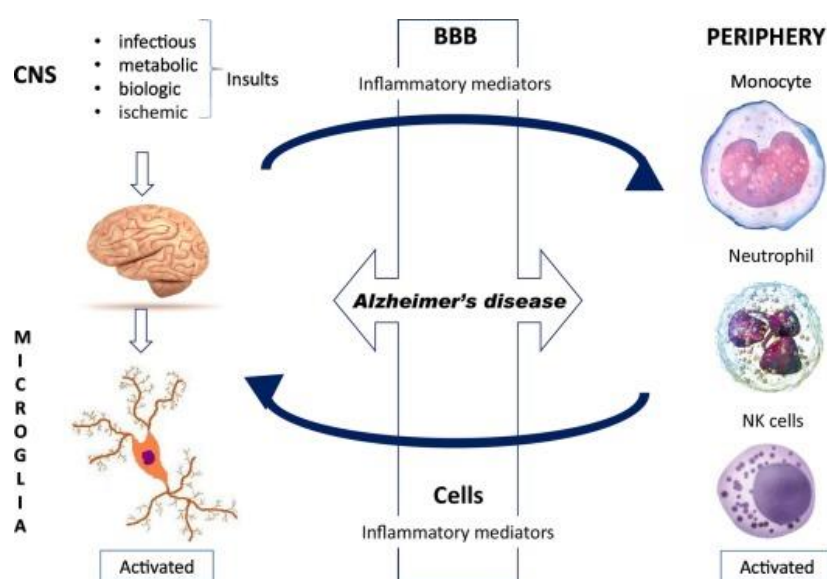


Рисунок 15 - Миграция моноцитов и нейтрофилов через ГЭБ при болезни Альцгеймера (цит. по: Le Page A. et al., 2018)

У здорового человека ГЭБ обеспечивает селективную проницаемость клеток крови из системного кровотока в паренхиму головного мозга. При БА проницаемость ГЭБ значительно возрастает из-за воспалительных изменений [216, 261]. В результате этого Т-лимфоциты пермеабелизируются в головной мозг, запуская иммуновоспалительные реакции. Усиливается выработка таких провоспалительных цитокинов, как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и провоспалительных хемокинов CCL-2 (фактор хемотаксиса моноцитов 2), CCL-11 (фактор хемотаксиса моноцитов 11), при этом уровень противовоспалительных цитокинов, напротив, снижается. В условиях *in vitro* стимуляции мононуклеарных клеток

периферической крови олигопептидами A $\beta$ 42 повышается продукция ими цитокинов и хемокинов. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что мононуклеарные клетки являются важными участниками воспалительного ответа при БА [152, 216, 230].

Также было доказано, что лимфоциты способствуют активации транспорта амилоида из мозга в кровотоки через ГЭБ. В норме ГЭБ играет роль защитного барьера между головным мозгом и иммунной системой для защиты от проникновения иммуноглобулинов и иммунокомпетентных клеток. При БА проницаемость ГЭБ существенно повышается, количество Т-лимфоцитов, мигрирующих в ткани головного мозга из периферической крови и обратно, возрастает [77, 146].

Инфильтрация головного мозга Т-лимфоцитами и выработка ими провоспалительных хемокинов провоцирует дополнительную активацию микроглии и астроцитов, способствующую гиперфосфорилированию тау-протеина (рис. 16, А, В). В то же время, активированные Т-клетки высвобождают нейротоксические факторы (гранзим, перфорин), нарушают целостность нейронов (взаимодействие опосредовано TCR/MHC I) (рис. 16, С) [163].

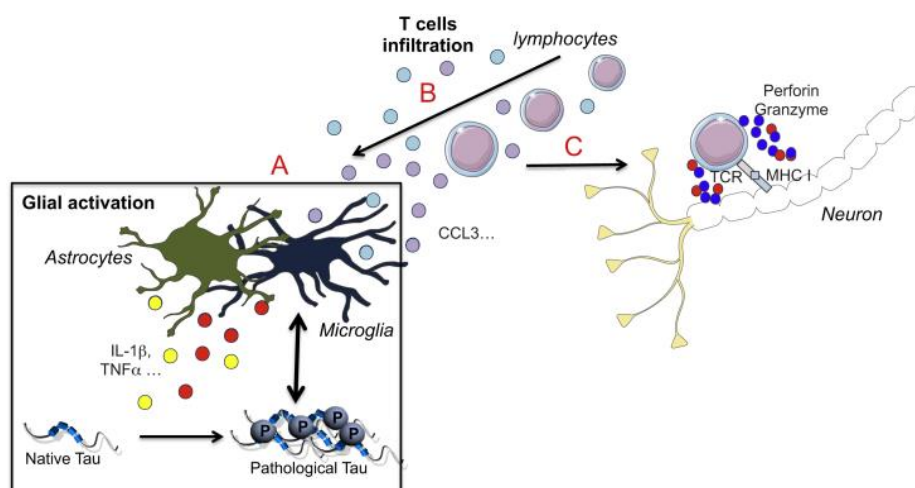


Рисунок 16 - Участие Т-лимфоцитов в гиперфосфорилировании тау-протеина и повреждении нейронов (цит. по: Laurent C. et al., 2018)

T-лимфоциты влияют и на продукцию  $A\beta$ . Накопление амилоида в головном мозге приводит к увеличению количества RAGE, VCAM-1 и других рецепторов, способствующих проникновению иммунокомпетентных клеток крови в ЦНС. Проникновение же T-лимфоцитов провоцирует продукцию ФНО- $\alpha$  и других цитокинов, способствующих еще большему отложению амилоидных бляшек (рисунок 17) [174].

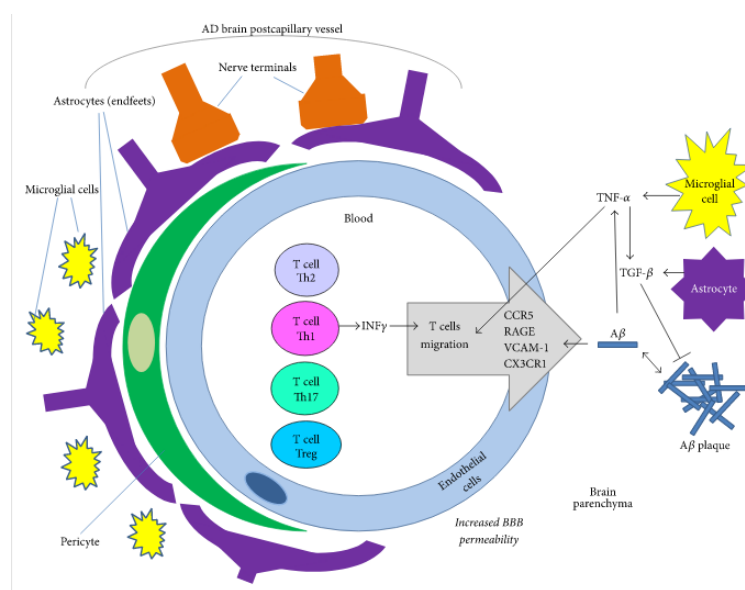


Рисунок 17 - Вовлечение T-лимфоцитов в амилоидогенез (цит. по: Mietelska-Porowska A. et al., 2017)

Ряд исследований направлено на выявление молекулярных и клеточных aberrаций в лимфоцитах периферической крови пациентов с БА (таблица 1) [68, 139, 167, 171, 219]

Таблица 1 - Молекулярные изменения в лимфоцитах при болезни Альцгеймера (модиф. по: Wojsiat J. et al., 2017, Grimm A. et al., 2016)

Патологические изменения	Показатель
Амилоидогенные изменения	<ul style="list-style-type: none"> <li>• накопление <math>A\beta</math></li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• повышение выработки белков теплового шока HSP60, HSP72</li> <li>• мутации митохондриальной ДНК</li> <li>• конформационные изменения белка p53</li> </ul>

Нарушения клеточного цикла	<ul style="list-style-type: none"> <li>• снижение пролиферации В-лимфоцитов</li> <li>• нарушение функционирования циклина D1 (переход клетки в пролиферативную фазу)</li> <li>• снижение уровня регуляторного циклина p21</li> <li>• нарушение функционирования фактора транскрипции NF-κB</li> </ul>
Иммунные нарушения	<ul style="list-style-type: none"> <li>• активация CD25</li> <li>• мутации С-С рецепторов хемокинов 5 и 6</li> <li>• продукция провоспалительных цитокинов</li> <li>• реактивация В-лимфоцитов</li> </ul>

Результаты подтверждают изменения в распределении различных типов лимфоцитов в крови пациентов с БА и снижение иммунных функций из-за снижения уровня Т и В-клеток в периферической крови [116]. Подтверждена повышенная активность теломеразы в лимфоцитах, что приводит к снижению активности пролиферации этих клеток, нарушениям функционирования иммунной системы у пациентов с БА [167]. Обнаружены изменения в регуляции клеточного цикла и реакциях ОС, нарушения в функциях митохондрий в лимфоцитах крови при БА [174].

Одним из основных источников ОС в МЯЛ являются митохондрии, поскольку они используют кислород для производства энергии. Регуляция клеточной гибели, по-видимому, тесно связана с их ролью в качестве основного внутриклеточного источника АФК, которые в основном генерируются в комплексах I и III дыхательной цепи, заставляя митохондрии увеличивать утечку супероксидных радикалов. Некоторые исследовательские группы считают показатели ОС потенциальными биомаркерами БА [195, 219].

В митохондриях, экстрагированных из лимфоцитов при БА, повышен уровень маркеров окисления белков (битирозина и карбониллов белка) и перекисного окисления липидов. Эти показатели коррелировали с повышенными уровнями дисульфида глутатиона и пониженными уровнями восстановленного глутатиона в плазме крови [195]. Недавние исследования показали, что



повышенная восприимчивость к ОС лимфоцитов у пациентов с БА коррелирует с тяжестью деменции [219].

В литературе практически не встречается информации об изменении активности катепсинов в мононуклеарных лейкоцитах при БА.

В целом мало известно о том, как молекулярные изменения влияют на функции лимфоцитов во взаимодействии между кровью и мозгом при иммунных реакциях у пациентов с БА и как они изменяют патогенез БА. Изучение метаболических отклонений в лимфоцитах крови перспективны в качестве потенциальных биомаркеров для ранней диагностики БА [216, 219].

### **1.7.2 Вклад полиморфноядерных лейкоцитов в развитие болезни**

#### **Альцгеймера**

Нейтрофилы, также, как и лимфоциты, вовлечены в процесс НД при БА. В мозговых кровеносных сосудах и паренхиме головного мозга пациентов с БА обнаруживается более высокое количество нейтрофилов по сравнению с контрольной группой того же возраста. Установлено, что нейтрофилы проникают через ГЭБ, затем происходит экстравазация и накопление клеток преимущественно в областях бляшек, образованных А $\beta$ . Это опосредовано молекулами адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, молекулы межклеточной адгезии), лигандами для которых является лейкоцитарный интегрин LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen, лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген). А $\beta$  усиливает аффинитет между данным интегрином и ICAM-1 [87, 182, 223].

В исследовании Popp et al. была обнаружена положительная корреляционная связь между длительностью течения БА, уровнем фосфорилированного тау в СМЖ и ICAM-1 (рисунок18) [171]. Связывание нейтрофилов с ICAM-1 на эндотелиальных клетках головного мозга может привести к трансмиграции нейтрофилов в паренхиму головного мозга.

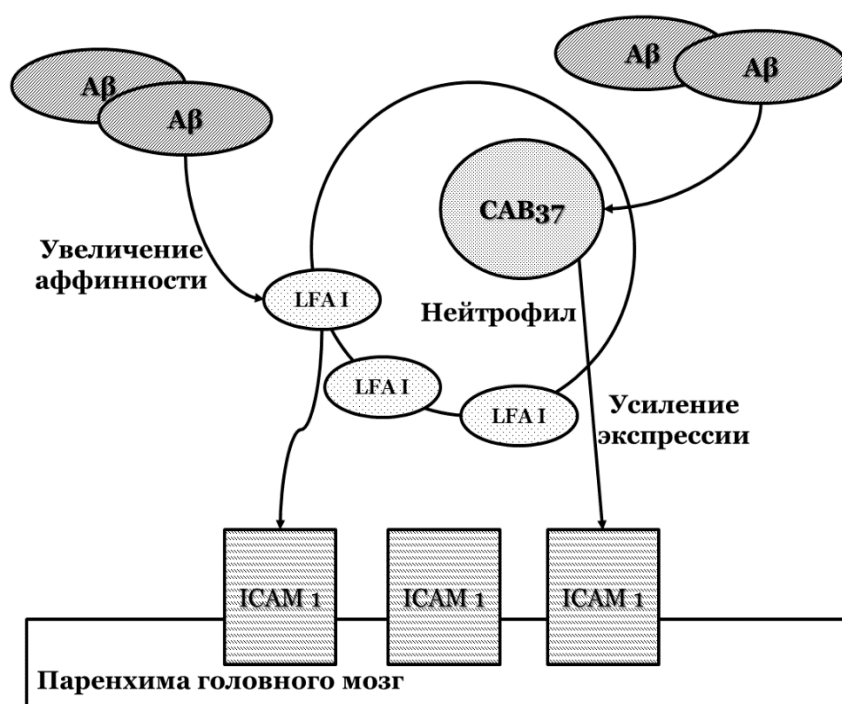


Рисунок 18 - Влияние амилоида  $\beta$  на миграцию нейтрофилов в ткани головного мозга (модиф. из: Stok A. et al., 2018, Popp J. et al., 2017)

Еще одним подтверждением негативного влияния нейтрофилов на развитие НД является тот факт, что при истощении нейтрофилов или LFA-1 в эксперименте улучшается когнитивная функция, уменьшается микроглиоз, снижается уровень A $\beta$ 1-42. Кроме того, истощение нейтрофилов снижало уровни фосфорилированного тау у экспериментальных животных [254].

Нейтрофилы содержат несколько видов гранул: азурофильные, специфические, желатиновые и секреторные (таблица 2).

Таблица 2 - Компоненты гранул нейтрофилов

Вид гранул	Компоненты, содержащиеся в гранулах
Азурофильные	<ul style="list-style-type: none"> <li>• миелопероксидаза</li> <li>• CAP37</li> <li>• нейтрофильная эластаза</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• катепсин G</li> <li>• катепсин B</li> <li>• катепсин D</li> <li>• глюкоуронидаза</li> <li>• глицерофосфатаза</li> <li>• маннозидаза</li> <li>• нуклеазы</li> </ul>
Специфические	<ul style="list-style-type: none"> <li>• лактоферрин</li> <li>• липокалин</li> <li>• лизоцим</li> <li>• кателицидин</li> <li>• коллагеназа</li> </ul>
Желатиназные	<ul style="list-style-type: none"> <li>• лизоцим</li> <li>• матриксная металлопротеиназа 9</li> <li>• лейколизин</li> <li>• катепсин B</li> <li>• катепсин D</li> </ul>
Секреторные	<ul style="list-style-type: none"> <li>• рецепторы ФНО<math>\alpha</math></li> <li>• рецепторы интерферона <math>\alpha</math></li> <li>• CAP37</li> </ul>

В азурофильных и секреторных гранулах содержится такой антибактериальный белок, как CAP37 (cationic antimicrobial protein 37, катионный антимикробный протеин). В мозге пациентов с БА наблюдается повышенная экспрессия CAP37 (рисунок18) [223]. CAP37 способствует развитию нейровоспаления, модулируя функции клеток микроглии [238]. Клетки микроглии активируются патоген-ассоциированными молекулярными структурами, экспрессируют большое количество рецепторов системы комплемента, молекул гистосовместимости, провоспалительных цитокинов и прооксидантов. При БА клетки микроглии активизируются, становятся нерегулируемыми и способствуют развитию нейровоспаления и нейродегенерации [166, 176, 180, 223].

Ещё один белок, содержащийся в азурофильных гранулах нейтрофилов, это катепсин G. Фермент относится к сериновым протеазам и осуществляет неспецифический лизис различных патогенов, захваченных фагоцитом. Катепсин G может разрушать пептидные связи в A $\beta$ <sub>1-42</sub> между Glu11-Val12, His14-Gln15, и

Gly25-Ser26, однако неизвестно, изменяется ли протеолитическая активность протеазы при БА [223].

Различные компоненты гранул нейтрофилов могут расщеплять амилоид по многим сайтам (рисунок 19).

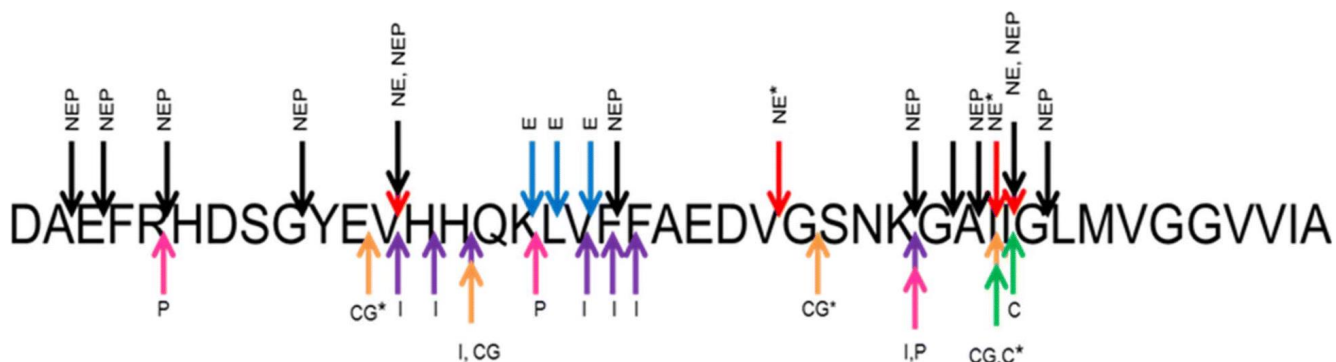


Рисунок 19 - Сайты расщепления амилоида  $\beta$  протеазами нейтрофильных гранул (цит. по: Stock A. et al., 2018)

Примечание: NEP – неприлизин

P – плазмин

NE-нейтрофильная эластаза

CG – катепсин G

I – инсулин-разрушающий фермент

C – CAP37

E – эндотелин-превращающий фермент

У пациентов с БА была обнаружена повышенная активность нейтрофильной эластазы. Это приводит к повреждению стенок сосудов головного мозга, что потенцирует НД [173]. Также усугубляет нейровоспаление у пациентов с БА и нейтрофильный липокалин [187].

В исследованиях, проведенных Vitte J. et al. обнаружены повышенные уровни активных форм кислорода в нейтрофилах периферической крови у пациентов с БА по сравнению с контрольной группой [198]. Аналогичные изменения, а также снижение фагоцитарной активности нейтрофилов наблюдалось в исследовании Le Page et al. [216] и Иванова П.А. с соавт. [155]. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови коррелирует с

длительностью течения БА. Нейтрофилы сохраняют способность поглощать микробы, но их переваривающая активность снижается уже на ранних стадиях болезни. На поздних стадиях наблюдается уменьшение количества фагоцитирующих нейтрофилов, снижение активности миелопероксидазы и увеличение содержания катионных белков в них [203].

В гранулах пМЯЛ содержатся катепсины В, D и G, (таблица 2), лизосомы этих клеток богаты различными протеазами. Однако вопрос об изменениях активности катепсинов в этой фракции лейкоцитов при БА является мало изученным.

Таким образом, фенотипические и метаболические изменения нейтрофилов коррелируют со степенью выраженности деменции при БА, поэтому могут представлять собой один из прогностических биомаркеров крови при НДЗ [188].

### **1.8 Заключение по разделу**

Изучение молекулярных механизмов патогенеза болезни Альцгеймера является актуальным направлением развития современной биохимии. Обнаружение информативных маркеров БА в тканях, легко доступных для лабораторного исследования (к которым, без сомнения, относятся клетки крови) важно не только для создания единой концепции патогенеза заболевания, но и для своевременной диагностики, мониторинга течения патологии, поиска терапевтических мишеней и разработки лекарственных средств.

Вовлеченность катепсинов в метаболические процессы, протекающие в нервной системе при БА, к настоящему моменту не вызывает сомнений. Известно, что ключевую роль в формировании амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков – основных патогномоничных признаков БА – играют APP и тау-протеин, которые подвергаются протеолитической обработке. Накопленные данные о вкладе лизосомальных цистеиновых протеиназ в развитие БА немногочисленны и противоречивы. Выдвигаются гипотезы как о нейропротекторном влиянии катепсина В, так и прямо противоположные,

свидетельствующие о патологическом воздействии, усугубляющем формирование Аβ. Сведений же об изменении активности катепсинов в периферических клетках крови при БА не встречается. Также не исследован вопрос взаимосвязи состояния активности цистеиновых протеаз и выраженности ОС в лейкоцитах пациентов с НДЗ.

Течение БА и ДСГ связано с активизацией свободнорадикальных процессов в тканях головного мозга. Развитие ОС потенцирует продукцию Аβ, в то же время наличие амилоидных отложений способствует продукции АФК. Одним из показателей выраженности ОС является уровень карбонильных производных белков, образующихся в результате модификации молекул протеинов под действием АФК. В современных библиографических источниках практически не встречается информации об уровне ОМБ в лейкоцитах при БА, не исследовано динамическое изменение показателя с течением заболевания.

Преобладание катаболических процессов над анаболическими, активация белоксинтезирующих систем, нарушение работы систем детоксикации приводят к развитию синдрома ЭИ в организме пациентов с БА. Несмотря на невысокую специфичность этого лабораторного показателя, он имеет высокую диагностическую ценность в комплексной оценке метаболических отклонений, имеющих место при заболевании, в том числе в аспекте динамического наблюдения. Степень выраженности ЭИ при НД, а также в динамике БА практически не изучена.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование

В соответствии со сформулированными целью и задачами был разработан дизайн исследования, включающий изучение клинического материала, полученного от пациентов. Базой исследования стала кафедра биологической химии с курсом КЛД ФДПО Рязанского государственного медицинского университета.

Материалом для исследования явились плазма крови и лейкоциты (пМЯЛ и МЯЛ) периферической крови пациентов, включенных в изучаемые группы (таблица 3). Группу наблюдения №1 составили 25 пациентов, находившихся на стационарном лечении и диспансерном наблюдении в ГБУ РО «Областная клиническая психиатрическая больница имени Н.Н. Баженова», имеющие диагноз «Болезнь Альцгеймера», установленный по современным критериям. В соответствии с диагностическими рекомендациями Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), утвержденной ВОЗ, прижизненный диагноз «Болезнь Альцгеймера» выставляется при наличии

Таблица 3 – Характеристика пациентов, включенных в исследуемые группы

Группа	Основной диагноз	Количество пациентов	Пол		Средний возраст, лет M±m
			Муж	Жен	
Группа наблюдения №1	Болезнь Альцгеймера	n=25	n=9	n=16	72,6±10,6
Группа наблюдения №2	Деменция сосудистого генеза	n=25	n=11	n=14	79,0±7,8
Группа сравнения	F 43.2	n=25	n=9	n=16	69,6±5,6

следующих обязательных признаков:

- 1) Наличие синдрома деменции;
- 2) Развитие множественного дефицита познавательных функций, который определяется сочетанием: расстройств памяти с ухудшением запоминания новой и/или воспроизведения ранее усвоенной информации и присутствием по крайней мере одного из следующих когнитивных нарушений: афазии; апраксии; агнозии; нарушения интеллектуальной деятельности;
- 3) Нарушения как памяти, так и когнитивных функций должны быть выражены настолько, что они вызывают снижение социальной или профессиональной адаптации больного по сравнению с ее прежним уровнем;
- 4) Течение заболевания с постепенным малозаметным началом и неуклонным прогрессированием нарушений снижением когнитивных функций;
- 5) Отсутствие данных клинического или специальных параклинических исследований, которые могли бы указать на то, что расстройства памяти и когнитивных функций обусловлены каким-либо другим заболеванием или повреждением центральной нервной системы, системным заболеванием, о котором известно, что оно может вызывать синдром деменции или состоянием интоксикации;
- 6) Признаки перечисленных когнитивных нарушений должны выявляться вне состояний помрачения сознания;
- 7) Анамнестические сведения и данные клинического исследования исключают связь выявляемых расстройств когнитивных функций с каким-либо другим психическим заболеванием (например, депрессией, шизофренией, умственной отсталостью и др.).

Пациенты группы наблюдения №1 получали холинергическую терапию (ингибиторы ацетилхолинэстеразы (степень доказательности А)), антагонисты NMDA (N-метил-D-аспартат-связывающий рецептор) рецепторов (степень доказательности А), нейропротекторные препараты (степень доказательности В).



В группу наблюдения №2 вошли 25 пациентов того же стационара с диагнозом «Деменция сосудистого генеза», не имеющие признаков НД. Согласно диагностическим критериям МКБ-10 сосудистая деменция - результат инфаркта головного мозга вследствие заболевания церебральных сосудов, включая цереброваскулярную болезнь при гипертензии. От пациентов с БА этих больных отличает, главным образом, скорость начала заболевания: острое, после перенесенной сосудистой катастрофы при ДСТ, и длительное, постепенное при БА. У пациентов группы наблюдения №1 также имеются признаки цереброваскулярной болезни, однако помимо этого наличие НД подтверждено результатами магнитно-резонансной томографии. Терапия, получаемая пациентами группы наблюдения №2, аналогична терапии пациентов с БА: нейропротекторные препараты (степень доказательности А), холинергическая терапия (ингибиторы ацетилхолинэстеразы (степень доказательности А)), антагонисты NMDA рецепторов (степень доказательности А).

В группу сравнения вошли 25 пациентов, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами группы наблюдения №1, находящиеся на стационарном лечении в ГБУ РО «Областная клиническая психиатрическая больница имени Н.Н. Баженова», с диагнозом «Расстройства приспособительных реакций» (F 43.2 по МКБ-10). У этих пациентов наблюдалось состояние субъективного дистресса и эмоционального расстройства, создающее трудности для общественной деятельности и поступков, возникающее в период адаптации к значительному изменению в жизни или стрессовому событию. Пациенты были осмотрены неврологом, терапевтом, а также психиатром. Признаков деменции больные не имели. Терапия, получаемая пациентами этой группы, не унифицирована, однако она не включала препаратов, влияющих на активность протеолитических ферментов и выраженность окислительного стресса.

Включение пациентов в группы осуществлялось после их добровольного информированного согласия. Критериями исключения для пациентов всех групп стали заболевания, для которых на сегодняшний день установлено увеличение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, а также нарастание уровня

окислительного стресса: онкологические и ревматоидные заболевания, патологии почек, сахарный диабет, гепатиты. Включение пациентов в исследование согласовано решением локального этического комитета РязГМУ, протокол №6 от 06.11.2018.

Для изучения изменений определяемых показателей в динамике БА пациенты группы наблюдения №1 были разделены на три группы в зависимости от длительности течения заболевания (таблица 4).

Таблица 4 –Разделение пациентов группы наблюдения № 1 в зависимости от длительности заболевания

Характеристика	Длительность течения болезни Альцгеймера		
	1-3 года	3-5 лет	5-10 лет
Количество пациентов	n=8	n=8	n=9
Мужчины	n=5	n=5	n=1
Женщины	n=3	n=3	n=8
Средний возраст, лет (M±m)	63,6±5,4	74,6±7,9	78,8±8,5

Пациенты группы №1 также были разделены на 2 группы в зависимости от тяжести деменции, определенной с помощью шкалы оценки психического статуса MMSE (Mini Mental State Examination) [133]. Шкала предназначена для оценки когнитивной сферы личности по следующим параметрам: 1) ориентировка во времени; 2) ориентировка в месте; 3) восприятие; 4) концентрация внимания; 5) память; 6) речевые функции. Каждый параметр оценивается по пятибалльной шкале, где «5 баллов» – функция сохранена, а «0 баллов» – функция утрачена полностью. При интерпретации результатов, полученных при оценке MMSE, выделяют следующие степени деменции: 0-10 баллов – тяжелая, 11-19 – умеренная, 20-23 – легкая, 24-27 – преддементные когнитивные нарушения.

Среди пациентов группы наблюдения №1 12 имели деменцию умеренной степени (оценка MMSE  $14 \pm 1,8$ ), 13 – тяжелую деменцию (оценка MMSE  $6 \pm 2,1$ ).

## 2.2 Получение материала для исследования

### 2.2.1 Забор и подготовка проб крови

После добровольного информированного согласия у пациентов однократно натощак проводился забор 10мл крови из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовался гепарин из расчета 10МЕ/мл крови (Гепарин 5000МЕ/мл, «Синтез», Россия).

С целью осаждения эритроцитов к крови, стабилизированной гепарином, добавляли 6% раствор декстрана (Полиглюкин раствор для инфузий 6%, ОАО «Биохимик», Россия) в соотношении 1:5. Полученную смесь отстаивали 30-40 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  («Vacuum Drier SPT-200», Польша) до осаждения эритроцитов [25]. По истечении этого времени образовавшуюся надосадоочную взвесь (плазму, обогащенную лейкоцитами) отбирали шприцем с иглой большого диаметра и использовали для дальнейшего выделения фракций лейкоцитов.

### 2.2.2 Выделение фракций лейкоцитов

Разделение лейкоцитов на фракции производили методом изопикнического центрифугирования (рис. 20) [18, 39].

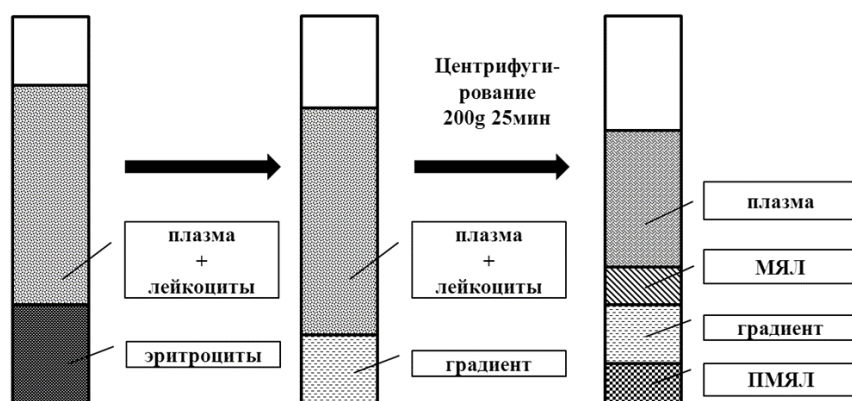


Рисунок 20 – Схема изопикнического разделения лейкоцитов

Плазму, обогащённую лейкоцитами, наслаивали на градиент с плотностью 1,077 (смесь полиглюкина 6% с урографинном (Урографин 76% «Bayer», Испания)) в соотношении 3:1 и центрифугировали при 200 g в течение 25 минут. Слой, содержащий мононуклеары и плазму, отбирали и центрифугировали при 600 g в течение 10 минут для отделения от плазмы. Осадок гранулоцитов обрабатывали 0,9 % раствором хлорида аммония и центрифугировали 10 минут при 600 g.

Полученные осадки лейкоцитов трижды отмывали 0,15М раствором хлорида натрия в соотношении 5:1, затем пропускали через капроновый фильтр для удаления конгломератов клеток. Число клеток подсчитывали в камере Горяева, используя микроскоп бинокулярный Р-15 «Биолам» фирмы ЛОМО.

Чистоту разделения лейкоцитов проверяли микроскопией окрашенных мазков из интерфазы и осадка (микроскоп бинокулярный Р-15 «Биолам»).

Содержание моноядерных лейкоцитов составляло не менее 96%, полиморфноядерных лейкоцитов –95%.

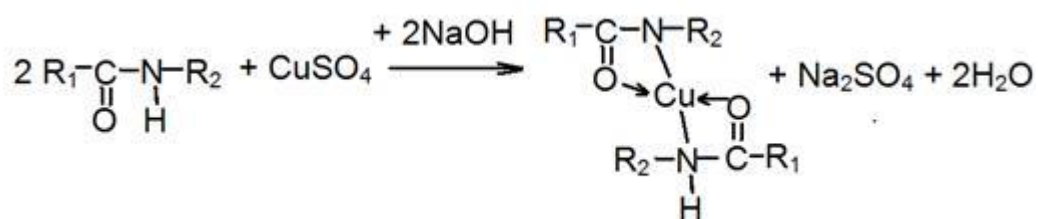
### **2.2.3 Получение гомогенатов лейкоцитов**

К полученным осадкам отмытых лейкоцитов добавляли 0,01мл 2% раствора тритона X – 100 (Triton X-100, «MPBiomedical», США), доводили до концентрации  $10^6 - 10^7$  клеток/мл дистиллированной водой и подвергали трёхкратному замораживанию – оттаиванию для окончательного разрушения плазматических и лизосомальных мембран. Для гомогенизации полученных смесей проводилось пипетирование через иглу малого диаметра. Нерастворимый материал осаждался центрифугированием (600g, 10 минут), жидкая надосадочная фаза использовалась для определения изучаемых показателей.

### **2.2.4 Определение содержания белка в плазме крови**

Концентрация белка в плазме крови определялась биуретовым методом с помощью набора «Общий белок-Ольвекс» («Ольвекс Диагностикум», Россия).

Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей с ионами двухвалентной меди; интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию белка в исследуемом образце.



К 0,1мл опытной пробы добавляли 5,0мл биуретового реактива, содержимое пробирки тщательно перемешивали, инкубировали при температуре 18-25°C 30 минут. После этого измерялась оптическая плотность исследуемых проб против контрольной пробы (5,0мл биуретового реактива и 0,1мл дистиллированной воды) при длине волны 540нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10мм.

### 2.2.5 Определение содержания белка в гомогенатах лейкоцитов

Концентрации белка в гомогенатах лейкоцитов определялась по методу Лоури (Lowry O.H., 1951) с помощью набора «Клини Тест-БЛ» («Эко Сервис», Россия).

Метод основан на способности ароматических аминокислот образовывать окрашенные продукты с реактивом Фолина-Чокальтеу в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию белка в исследуемой пробе.

К 0,4мл пробы приливали 2мл рабочего раствора, содержащего 2% раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0,1н растворе  $\text{NaOH}$  и 0,5% раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1% растворе цитрата натрия, перемешивали и оставляли пробу на 10 минут при комнатной температуре. Затем к реакционной смеси добавляли 0,2мл реактива Фолина-Чокальтеу, тщательно перемешивали и через 20 минут определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре КФК 3 – 01 «ЗОМЗ» при длине волны 750нм, используя кювету с длиной оптического пути 10мм. Расчёт содержания белка проводили по калибровочной кривой, построенной с использованием

раствора бычьего сывороточного альбумина. Содержание белка выражали в мг/мл или мг/г исследуемого образца.

### 2.3 Определение активности катепсинов

Активность катепсинов В, L и Н изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke [80] с измерением флюоресцирующего продукта реакции–7-амидо-4-метилкумарина, образующегося при расщеплении специфических флюорогенных субстратов (таблица 5).

Таблица 5 - Субстраты и буферные растворы для катепсинов В, L, Н

Катепсин	Флюорогенный субстрат	Торговое название и производитель субстрата	Буферный раствор
Катепсин В	Na-карбобензоксиг-аргинин-аргинин-7-амидо-4-метилкумарин	«Na-CBZ-Arg-Arg-7-амидо-4-метилкумарин», «Sigma», USA	Ацетатный буфер с pH 6,0
Катепсин L	Na-карбобензоксиг-L-фенилаланил-аргинин-7-амидо-4-метилкумарин	«Na-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарин», «Sigma», USA	Ацетатный буфер с pH 5,5
Катепсин Н	аргинин – 7 – амидо – 4 – метилкумарин	«Arg – 7– амидо – 4 – метилкумарин», «Sigma», USA	Na/K/фосфатный буфер с pH6,8

В основе метода лежит количественное определение 7 – амидо – 4 – метилкумарина, образующегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи в соответствующем субстрате.

Для определения активности катепсина к 0,4мл субстратно – буферного раствора, содержащего 20мкл соответствующего субстрата, 8мкл дитиотриетол и

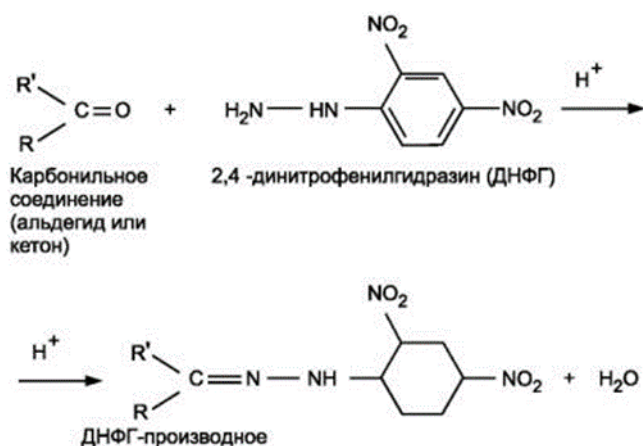
2мкл ЭДТА в буферном растворе с соответствующим значением pH преинкубированного в течение 2-х минут при 37°C, добавляли 0,1мл исследуемого материала. Полученную реакцию смесь инкубировали в течение 60 минут при температуре 37°C, после чего реакцию останавливали добавлением 2,0мл раствора холодного 0,1М ацетатного буфера с pH 4,0. Контрольной служила проба, содержащая те же компоненты, за исключением исследуемого материала с изучаемым ферментом, который вносился в конце инкубации непосредственно после добавления ацетатного буфера pH 4,0.

Продукты реакции определяли на спектрофлуориметре «System 3 Scanning Spectrofluorometr» производства «Optical technology devices, inc. Elmstord, NewYork, 10523» при  $\lambda=360\text{nm}$  (возбуждение) и  $\lambda=440\text{nm}$  (эмиссия).

Активность ферментов выражали в нмоль 7-амидо-4-метилкумарина/ч  $\times 10^6$  клеток для лейкоцитов, в нмоль 7-амидо-4-метилкумарина/ч  $\times \text{л}$  для плазмы крови.

## 2.4 Оценка содержания продуктов окислительной модификации белка

Оценка интенсивности окислительной модификации белков в исследуемых образцах проводилась по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [41].



Методика основывается на реакции взаимодействия карбонильных групп и иминогрупп окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-

динитрофенилгидразонов, обладающих специфическим спектром поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

#### **2.4.1 Оценка спонтанной окислительной модификации белка**

Уровень спонтанной ОМБ отражает количество присутствующих в пробе (фактически – образовавшихся *in vivo*) карбонильных производных белков. Для оценки данного показателя к 0,1мл исследуемого материала добавлялся 1мл 20% ТХУ для осаждения белка и 1мл 0,01М раствора 2,4-ДНФГ. Контрольная проба содержала те же компоненты, с заменой 2,4-ДНФГ на 1мл 2М соляной кислоты. Пробы инкубировались 60 минут в темном месте при комнатной температуре, после чего проводилось центрифугирование в течение 15 минут при 3000 оборотах /мин.

Для экстракции липидов, удаления свободного 2,4-ДНФГ и устранения экстрагирующих реагентов трехкратно проводились отмывка образовавшихся осадков с помощью спирт-эфирной смеси (1:1 96% этиловый спирт и этилацетат) и центрифугирование при 3000 оборотах/мин в течение 5 минут.

Образовавшиеся осадки высушивались, а затем растворялись в 8М растворе мочевины. Оптическую плотность образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов определяли спектрофотометрически на длинах волн ультрафиолетового спектра: 230, 254, 270, 280, 356нм (альдегид-динитрофенилгидразоны,  $S_{uv}АДНФГ$ ), 363, 370нм (кетон-динитрофенилгидразоны,  $S_{uv}КДНФГ$ ); и видимого спектра: 428, 430нм (альдегид –динитрофенилгидразоны  $S_{vs}АДНФГ$ ), 434, 520, 524, 530 и 535нм (кетон-динитрофенилгидразоны  $S_{vs}КДНФГ$ ). Результаты пересчитывались на мл плазмы или мг белка гомогената лейкоцитов.

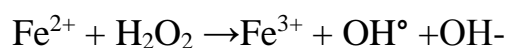
Комплексная оценка содержания продуктов карбонилирования белков осуществляется на основе авторской методики, разработанной на кафедре биологической химии РязГМУ (Пат. 2524667 РФ, МПК G01N 33/52 Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков



в тканях и биологических жидкостях / Фомина М.А. [и др.]; Ряз. гос. мед. ун-т им. И.П. Павлова. – 2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014, Бюл. № 21).

#### **2.4.2 Оценка металл-катализируемой (индуцированной) окислительной модификации белка**

Описанная выше методика определения уровня динитрофенилгидразонов проводилась аналогично (п.2.4.1) после *in vitro*-инкубации исследуемого материала с *ex tempore* приготовленным реактивом Фентона, который состоит из 0,1мл 4мМ FeSO<sub>4</sub>, 0,1мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации 3x10<sup>-4</sup> М и 0,1мл 0,5мМ ЭДТА. Двухвалентное железо при этом реагирует с перекисью водорода, образуются радикалы OH<sup>•</sup> и OH<sup>-</sup> по реакции Фентона:



Добавление ЭДТА в реакционную смесь необходимо для сохранения в растворе окисленной формы железа.

Результаты измерения индуцированной таким образом ОМБ отражают сумму как изначально присутствующих в среде карбонильных производных (сформированных *in vivo*), так и дополнительно образовавшихся *in vitro* под действием реактива Фентона. При этом, чем меньше способность антиоксидантов противостоять свободно радикальному окислению, тем выше уровень индуцированной ОМБ. Результаты пересчитывались на мл плазмы или мг белка гомогената лейкоцитов.

#### **2.4.3 Оценка резервно-адаптационного потенциала**

Параллельная оценка уровней спонтанной и индуцированной ОМБ в исследуемом материале позволяет определить величину резервно-адаптационного потенциала (рисунок 21).

Для подсчета РАП определяется отношение спонтанной ОМБ к металл-катализируемой, принимая значение последней за 100%.



Рисунок 21 – Схема определения резервно-адаптационного потенциала

Чем сильнее возрастает уровень ОМБ в пробе при добавлении реактива Фентона, тем выше содержание в образце аминокислотных остатков, легко образующих кето- и альдегидные карбонильные производные, а значит ниже способность противостоять окислительному стрессу.

## 2.5 Определение уровня веществ низкой и средней молекулярной массы

Содержание веществ низкой и средней молекулярной массы проводилось спектрофотометрически по методике М.Я. Малаховой [18]. Метод основан на регистрации спектра поглощения света различных длин волн (от 238 до 300нм с шагом в 4нм) теми веществами, которые остались в среде после удаления крупномолекулярных белков.

К 1мл исследуемого материала добавлялось 0,5мл 15% раствора ТХУ, содержимое пробирки тщательно перемешивалось. После инкубации в течение 5-7 минут при комнатной температуре проводилось центрифугирование в течение 30 минут при 3000 оборотах/мин. 0,5мл образовавшегося после центрифугирования супернатанта разводили дистиллированной водой в соотношении 1:9. Регистрация спектра поглощения проводилась на длинах волн 238-300нм с шагом в 4нм.

Для расчета конечного результата (суммарного уровня веществ низкой и средней молекулярной массы) проводился подсчет площади фигуры, образованной полученными значениями экстинкций для каждого измерения ВНиСММ плазмы и фракции лейкоцитов, путем умножения суммы значений на шаг длины волны (4нм):

$$\text{ВНиСММ} = (E_{238} + E_{242} + E_{246} + \dots + E_{300}) \times 4 \text{ (усл. ед)}$$

Для построения графиков спектров поглощения ВНиСММ использовались медианы значений полученных экстинкций.

## **2.6 Методы статистической обработки полученных результатов**

Полученные в ходе исследования результаты обрабатывались статистически согласно руководству по медицинской статистике с помощью современных программных пакетов математико-статистического анализа: «Microsoft Excel 2016» и «Statistica 10.0», работающие в операционной среде «Windows».

Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Так как отмечалось отсутствие нормального распределения в исследуемых группах, для описания количественных признаков в выборках рассчитывались показатели медианы (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значения, результаты представлялись в формате Me [min; max]. Статистическая достоверность различий количественных признаков между двумя группами оценивались по непараметрическому критерию Манна-Уитни (U-тест), между тремя группами – с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Корреляционный анализ между активностью катепсинов и уровнем окислительной модификации белков проводился с помощью программы «Statistica 10.0» с определением коэффициента Спирмена (r). Отличия принимались за статистически значимые при значениях  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Определение активности катепсинов плазмы крови и лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера и деменцией сосудистого генеза

#### 3.1.1 Изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в плазме крови

При обработке полученных в ходе исследования результатов было обнаружено, что в плазме крови пациентов с БА активность катепсинов В, L, Н статистически значимо повышена по сравнению с пациентами, не имеющими признаков НД (группа сравнения) ( $p=0.04$ ,  $p=0.03$ ,  $p=0.05$  соответственно). Среди изучаемых ферментов наиболее существенна степень повышения активности катепсина L (увеличение в 4 раза относительно группы сравнения), в то время как активность катепсина В повышена в 2,5 раза, а катепсина Н – в 1,4 раза (рисунок 22).

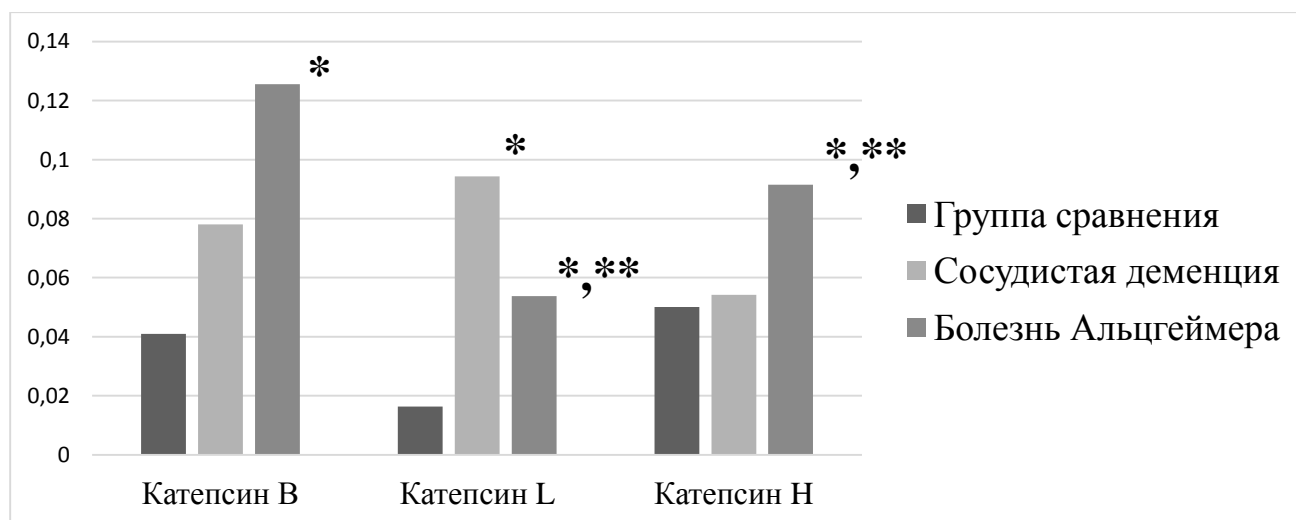


Рисунок 22 - Активность цистеиновых катепсинов в плазме крови (нкат/мл)

\* - статистически достоверное отличие групп наблюдения (БА и ДСГ) от группы сравнения;

\*\* - статистически достоверное отличие группы ДСГ от группы БА

Активность катепсина В в плазме крови пациентов с БА превышает не только соответствующий показатель в группе сравнения, но и в группе пациентов с ДСГ (в 1,4 раза). Это доказывает существенный вклад фермента в патогенез НДЗ, возможность использовать его в качестве биомаркера в проспективных исследованиях [69, 71, 89, 110, 209]. Полученные результаты согласуются с результатами исследования Sundelof et al., в котором также было обнаружено повышение активности катепсина В в плазме крови при БА по сравнению со здоровыми лицами [141]. В исследовании Morena et al. выявлено повышение секреции фермента в плазме крови у пациентов с тяжелой формой БА [69].

Повышение активности катепсина В в плазме крови при БА можно объяснить его способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, а также активным участием фермента в метаболизме APP [178, 222]. При БА происходит перераспределение лизосомального фермента: в результате повышения проницаемости лизосомальной мембраны катепсин В выходит в цитоплазму, а затем и во внеклеточное пространство. Это приводит к повышению содержания катепсина в СМЖ [119].

Активность катепсина L в плазме крови группы пациентов с ДСГ повышена как относительно группы сравнения, так и относительно группы пациентов с БА (в 7 и 1,75 раз соответственно). В исследовании Morena et al. не выявлено существенного повышения активности катепсина L в плазме крови при БА [69]. Деменция сосудистого происхождения, вероятно, сопровождается более значительным изменением компартментализации этого фермента, выходом из лизосом в межклеточное пространство и повышением его активности в крови.

Вызывает интерес существенное повышение активности катепсина Н в плазме крови пациентов с БА. Катепсин Н является аминопептидазой, обладающей эндопептидазной активностью. Повышение активности катепсина Н можно объяснить участием данного фермента в метаболизме модифицированных липопротеинов низкой плотности, в состав которых входит апопротеин Е (АpoЕ). Доказано участие белка АpoЕ как в формировании амилоидных бляшек, так и в метаболизме APP. Изоформа АpoЕ4 наиболее подвержена расщеплению

протеазами, а образующийся при этом С-терминальный фрагмент молекулы обладает выраженными нейротоксическими свойствами [1].

### 3.1.2 Активность цистеиновых катепсинов в лейкоцитах

При оценке активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в пМЯЛ пациентов с БА выявлено следующее: активность катепсинов В и Н повышена в 19,6 ( $p=0,01$ ) и 10 раз соответственно ( $p=0,04$ ) относительно группы сравнения, активность катепсина L - в 1,2 раза (рисунок 23).

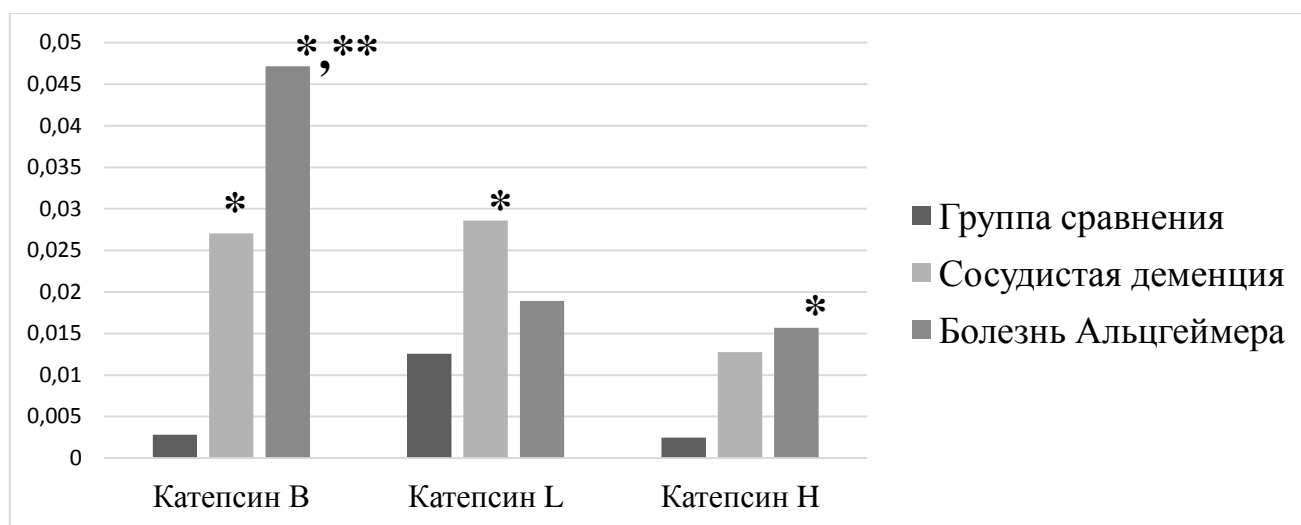


Рисунок 23 - Активность цистеиновых катепсинов в пМЯЛ (нкат/млн клеток)

В пМЯЛ пациентов с ДСГ активность всех трех катепсинов выше, чем у группы сравнения (статистически достоверно для катепсина В,  $p=0,047$ , и катепсина Н,  $p=0,05$ ). Однако активность катепсина L в пМЯЛ данных больных несколько выше, чем у пациентов с БА (рисунок 23).

В МЯЛ пациентов с БА отмечаются следующие изменения активности протеиназ: наиболее выражено нарастание активности катепсина В – повышение в 5 раз относительно группы сравнения ( $p=0,01$ ), в 4,7 раз повышена активность катепсина L ( $p=0,03$ ), и в 3 раза катепсина Н ( $p=0,05$ ) (рисунок 24).

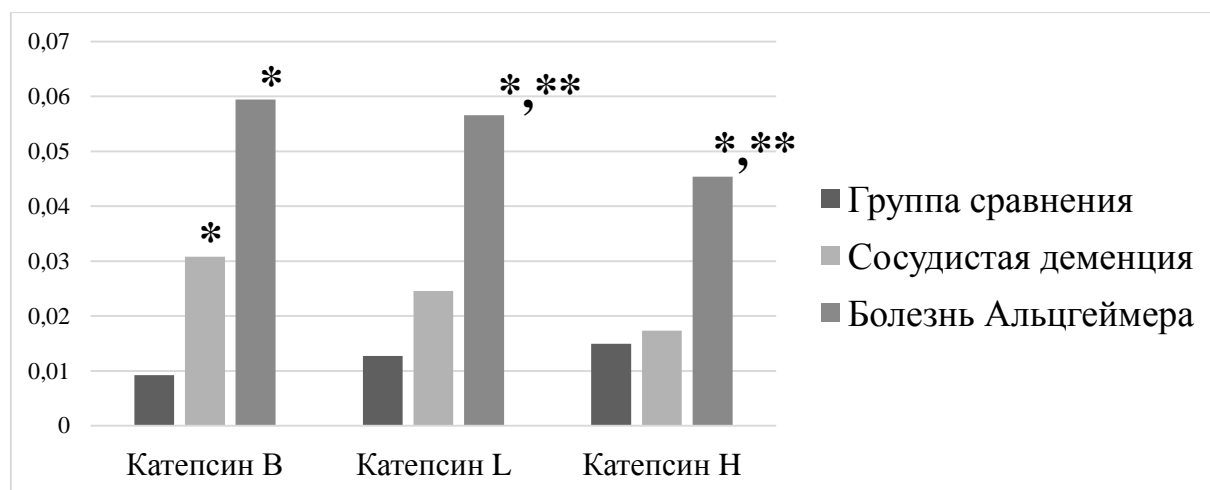


Рисунок 24 - Активность цистеиновых катепсинов в МЯЛ (нкат/млн клеток)

Полученные результаты позволяют предположить вовлеченность лизосомальных протеаз лейкоцитов в нейродегенеративный процесс.

Во фракционированных лейкоцитах наблюдается однонаправленная тенденция: преимущественное повышение активности катепсинов В и Н на фоне незначительного повышения активности катепсина L. В специфических гранулах нейтрофилов содержится более 20 различных видов протеаз, а на мембранах клеток находится огромное число рецепторов (для различных интерлейкинов, факторов системы комплемента и других биологически активных молекул), определяющих их функциональную активность. пМЯЛ содержат большое количество лизосом, к нарушению целостности лизосомальной мембраны могут приводить различные факторы, в том числе гипоксия, окислительный стресс, сниженный синтез инсулина [232]. Разрушение лизосомальных мембран пМЯЛ и выход катепсинов В и Н в цитоплазму можно считать патогенетически значимым фактором при БА и развитии нейродегенерации. Учитывая повышенную концентрацию данных клеток вокруг А $\beta$  и способность лейкоцитов проникать через гематоэнцефалический барьер, изменение уровня активности катепсинов лейкоцитов крови является важным периферическим биомаркером нейродегенеративного процесса.

### 3.1.3 Динамика изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ с течением болезни Альцгеймера

Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы крови с течением БА изменяется не существенно (рисунок 25). Отмечается тенденция к постепенному снижению активности катепсина В в плазме у пациентов с течением БА, в то время как активность катепсинов L и Н изменяется незначительно.

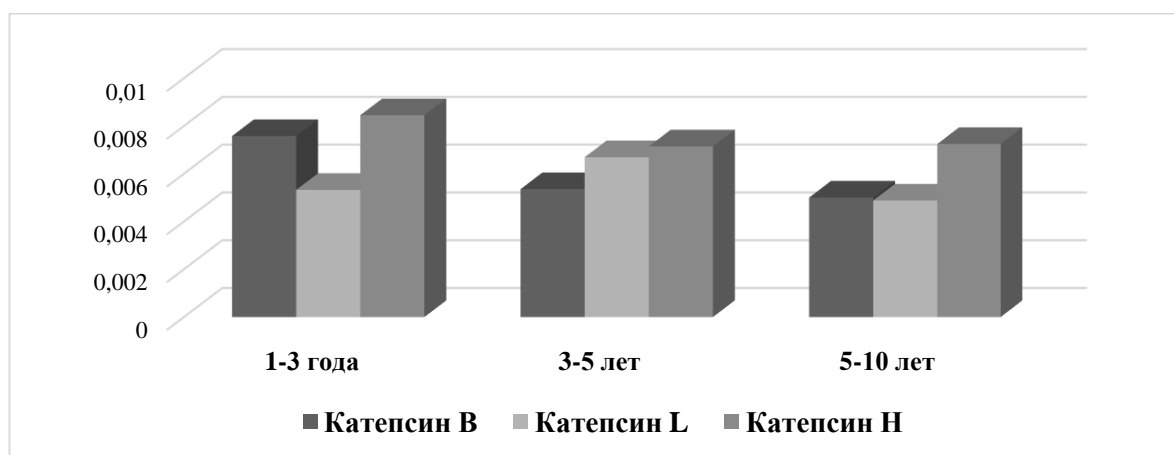


Рисунок 25 - Изменение активности катепсинов в плазме крови в динамике болезни Альцгеймера

Morena et al. выявили корреляцию между степенью повышения активности фермента и степенью тяжести деменции при БА: у пациентов с тяжелой деменцией активность катепсина В повышалась в крови значительно сильнее, чем у пациентов с легкой деменцией [69]. В исследовании Hook et al. отмечено, что активность катепсина В повышена как у пациентов с легким течением БА, так и с тяжелым, отмечается положительная корреляция между активностью фермента и степенью нарастания когнитивных нарушений [98]. Однако в выявленной закономерности нельзя исключить влияние возрастного фактора, так как у ряда пациентов выявлено связанное со старением повышение активности катепсина В в СМЖ [118].

При анализе динамических изменений активности катепсинов во фракционированных лейкоцитах при БА была выявлена однонаправленная



тенденция: и в пМЯЛ, и в МЯЛ с течением заболевания (группа 3-5 лет) первоначально нарастает активность катепсина L (в пМЯЛ в 2,15 раз, в МЯЛ – в 2,6 раз) по сравнению с группой 1-3 года, а затем снижается (в 1,5 раза в пМЯЛ, в 1,6 раз в МЯЛ) в группе с длительностью БА 5-10 лет (рисунки 26, 27).

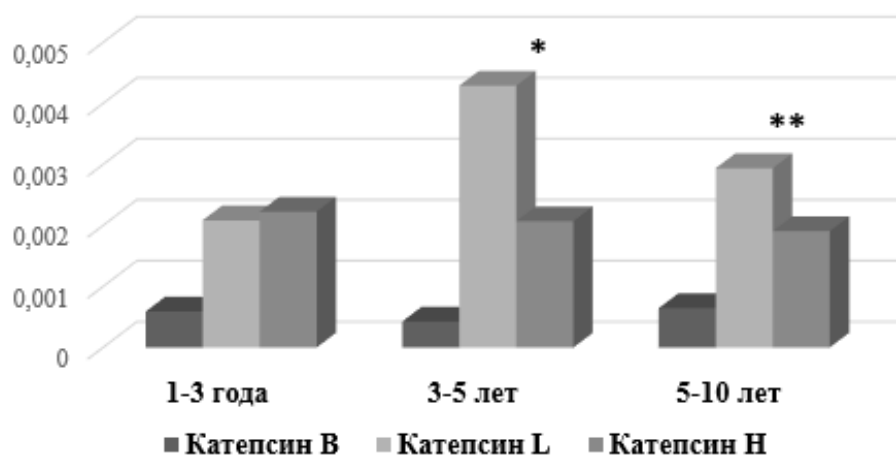


Рисунок 26 - Изменение активности катепсинов в пМЯЛ в динамике болезни Альцгеймера

\* - статистически достоверное отличие группы 3-5 лет от группы 1-3 года,  $p < 0,05$

\*\* - статистически достоверное отличие группы 5-10 лет от группы 3-5 лет,  $p < 0,05$

Одной из функций катепсина L в головном мозге является участие в синтезе пептидных нейромедиаторов (нейропептидов): энкефалина, нейропептида Y, динорфина, холецистокинина, галанина и других. Первоначально они синтезируются в виде неактивных предшественников - прогормонов. Подвергаясь процессингу в виде частичного протеолиза, в котором катепсин L занимает ключевую роль, полипептидные молекулы укорачиваются, превращаясь в активные нейромедиаторы. Функции регуляторных нейропептидов в головном мозге многочисленны: анальгезия, синтез гормонов, метаболизм глюкозы, запоминание и хранение информации, контроль артериального давления и многие другие [98, 102, 119, 250].

При БА нейропептиды проявляют нейропротекторные свойства. В областях мозга, отвечающих за процессы обучения и памяти, содержится наибольшее количество нейронов, содержащих в везикулах соответствующие нейропептиды. При БА происходят дегенеративные изменения нейронов этих областей мозга, что клинически проявляется деменцией. Синтез нейропептидов при этом снижается [181, 186, 253].

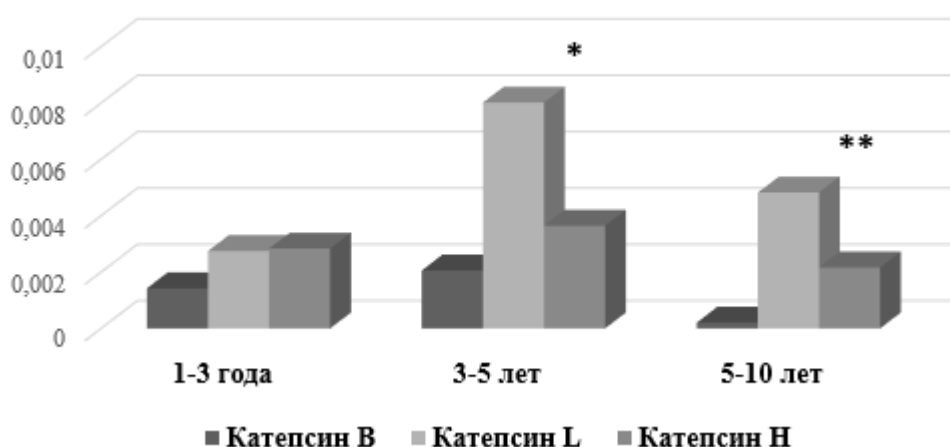


Рисунок 27 - Изменение активности катепсинов вМЯЛ в динамике болезни Альцгеймера

\* - статистически достоверное отличие группы 3-5 лет от группы 1-3 года,  $p < 0,05$

\*\* - статистически достоверное отличие группы 5-10 лет от группы 3-5 лет,  $p < 0,05$

Повышение активности катепсина L в лейкоцитах пациентов с БА может быть связано с адаптационными механизмами, протекающими в ЦНС. Провоцируемые накоплением амилоида нейродегенеративные процессы сопровождаются одновременной активацией защитно-приспособительных механизмов. Катепсин L, как протеаза, участвующая в процессинге нейропротекторных пептидов, адаптивно повышает свою активность. Однако с течением заболевания резервно-адаптационные механизмы организма истощаются, что может объяснить снижение активности катепсина у пациентов с длительным течением БА. Кроме того, сам фермент может подвергаться окислению наряду с другими белками. В исследовании Zeng et al.

было показано, что действие прооксидантов инактивирует катепсины В и L за счет формирования внутримолекулярных цистеиновых сшивок в активном центре ферментов. Это в свою очередь способствует накоплению модифицированных белков у пациентов с сахарным диабетом, атеросклерозом, катарактой, БА [259].

Первичные компоненты амилоидных бляшек – А $\beta$  и тау-протеин – являются долгоживущими белками, которые с течением времени подвергаются изомеризации и эпимеризации. Эти процессы существенно снижают расщепление белков лизосомальными ферментами [221]. При длительном течении БА количество накопленных патологических белков в головном мозге возрастает значительно, с чем может быть связано снижение активности катепсина L. Как длительность заболевания достоверно не сказывается на изменении активности катепсинов плазмы при БА (рисунок 25), так и степень выраженности деменции не влияет на изучаемый показатель (рисунок 28).

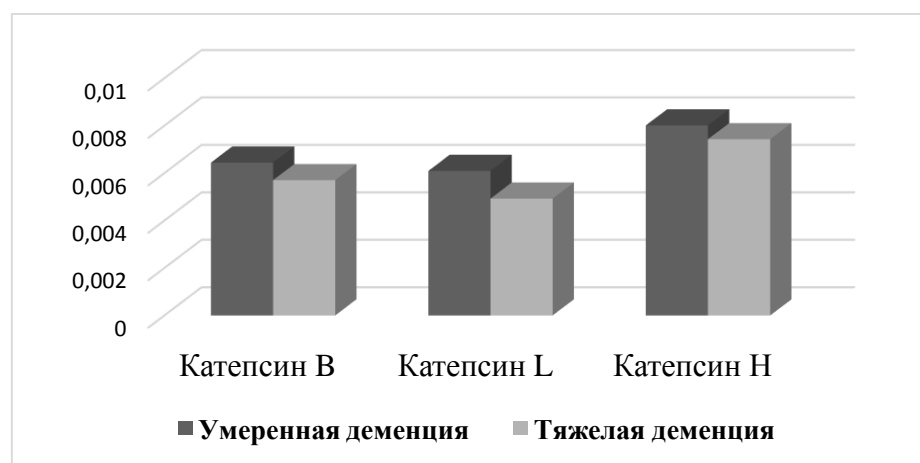


Рисунок 28 – Активность цистеиновых катепсинов у пациентов с различной степенью деменции при болезни Альцгеймера

Для пМЯЛ выявлена следующая закономерность: у пациентов с тяжелой степенью деменции активность катепсина L в 2,1 раза выше ( $p < 0.05$ ), чем у пациентов с умеренно выраженной деменцией (рисунок 29). В МЯЛ напротив – у группы с тяжелой деменцией активность катепсина L в 1,5 раза ниже ( $p < 0.05$ ), чем при деменции умеренной степени.

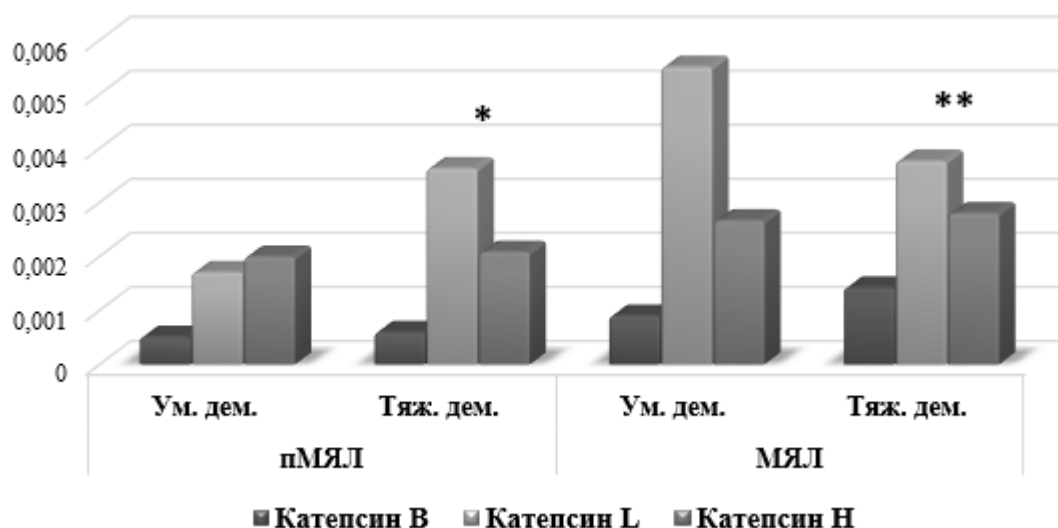


Рисунок 29 – Активность катепсинов в фракционированных лейкоцитах пациентов с умеренной и тяжелой деменцией, вызванной болезнью Альцгеймера  
 \* - статистически достоверное отличие активности катепсина L в пМЯЛ группы с тяжелой деменцией по отношению к группе с умеренной деменцией,  $p < 0.05$   
 \*\* - статистически достоверное отличие активности катепсина L в MЯЛ группы с тяжелой деменцией по отношению к группе с умеренной деменцией,  $p < 0.05$

### 3.2 Определение уровня окислительной модификации белков в плазме и лейкоцитах при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза

#### 3.2.1 Уровень окислительной модификации белков плазмы крови

Карбонильные производные формируются в результате окисления боковых радикалов аминокислот в составе полипептидной цепи. Альдегидные производные (АДНФГ) считают ранними маркерами окислительной деструкции белка, а кетонные (КДНФГ) - поздними. Регистрация в исследуемом материале данных показателей позволяет оценить степень выраженности окислительного стресса, а также длительность и интенсивность повреждения белков [59, 60].

Окислительный стресс наблюдается как в группах наблюдения (БА и ДСГ), так и в группе сравнения (таблица 6). На это указывает суммарное количество продуктов спонтанной ОМБ в плазме крови, статистически не отличающееся в исследуемых группах. Однако в плазме крови пациентов с БА доля кетонных

производных ОМБ, относящиеся к поздним маркерам окислительной деструкции белка, несколько выше, чем у пациентов с ДСГ и группы сравнения, что свидетельствует о наступлении не только фрагментации поврежденных протеинов, но и процессах агрегации белковых дериватов (рисунок 30).

Таблица 6 - Площадь под кривой окислительной модификации белков плазмы крови (у.е./г белка) (Me [min; max])

	Спонтанная ОМБ			Индукцированная ОМБ (металлкатализируемая)		
	Группа сравнения	Сосудистая деменция	Болезнь Альцгеймера	Группа сравнения	Сосудистая деменция	Болезнь Альцгеймера
S АДНФГ <i>uv</i>	0,142 [0,042; 0,321]	0,092 [0,031; 0,298]	0,060 [0,020; 0,371]	0,149 [0,055; 0,699]	0,203 [0,072; 0,572]	<b>0,523*</b> [0,283; 0,752]
S АДНФГ <i>vs</i>	0,024 [0,013; 0,065]	0,018 [0,015; 0,302]	0,030 [0,013; 0,152]	0,053 [0,019; 0,265]	0,096 [0,032; 0,402]	<b>0,171*</b> [0,071; 0,376]
S КДНФГ <i>uv</i>	0,040 [0,011; 0,096]	0,036 [0,019; 0,201]	0,039 [0,010; 0,155]	0,069 [0,036; 0,265]	0,105 [0,079; 0,314]	<b>0,196*</b> [0,077; 0,379]
S КДНФГ <i>vs</i>	0,004 [0,001; 0,011]	0,002 [0,001; 0,018]	0,004 [0,002; 0,026]	0,007 [0,002; 0,042]	0,015 [0,007; 0,039]	<b>0,022*</b> [0,010; 0,067]
S ОМБ	0,214 [0,076; 0,423]	0,148 [0,056; 0,648]	0,133 [0,044; 0,701]	0,269 [0,112; 1,272]	0,419 [0,117; 1,025]	<b>0,901*</b> [0,479; 1,575]

Примечание: *uv* – уровень карбонильных производных, измеренных в спектре ультрафиолетового излучения (нейтральный характер);

*vs* – уровень карбонильных производных, измеренных в спектре видимого излучения (основной характер);

\*-статистически достоверное отличие уровня индуцированной ОМБ группы наблюдения (БА) по отношению к группе сравнения,  $p < 0,05$ .

В обеих группах наблюдается преимущественное накопление кето- и альдегидных производных нейтрального характера, что указывает на повреждение в большей степени нейтральных аминокислотных радикалов [60].

Кроме регистрации уровня спонтанной окислительной модификации белков, проводилась оценка уровня металл-катализируемого окисления,

закрывающаяся в оценке суммарного уровня карбонильных производных, сформировавшихся под воздействием активных форм кислорода и добавленных в реакционную смесь ионов металла переменной валентности (в частности  $Fe^{2+}$ ), и находящихся в среде до добавления реагента [37, 60].

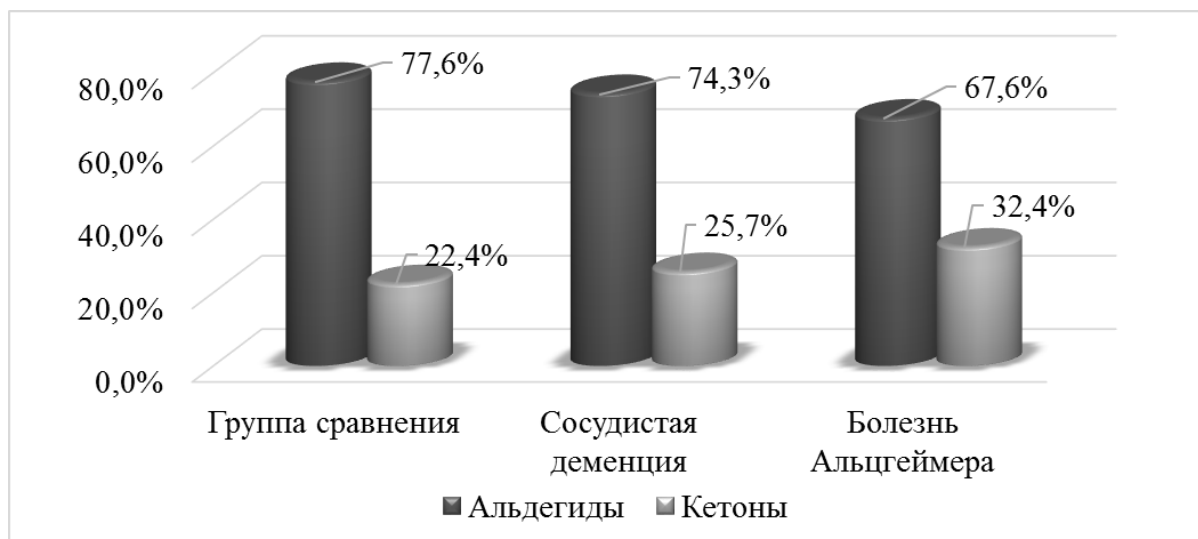


Рисунок 30 - Доля альдегидных и кетонных производных спонтанной ОМБ в плазме крови

Определение уровня металлкаatalизируемой ОМБ плазмы показало, что в группе пациентов с БА существенно повышается уровень как кетопроизводных, так и альдегидных производных (таблица б). Высокая степень нарастания доли КДФГ у пациентов с БА указывает на активный переход первичных маркеров во вторичные (прямой механизм окислительного стресса). Это свидетельствует об истощении резервных сил организма, низкой способности противостоять реакциям свободно-радикального окисления [15, 197]. Индуцированное окисление не вызвало существенного повышения карбонильных производных в плазме крови пациентов с сосудистой деменцией и в группе сравнения.

### 3.2.2 Уровень окислительной модификации белков полиморфноядерных лейкоцитов

Статистически достоверных различий в уровне и соотношении кето- и альдегидных производных спонтанной ОМБ пМЯЛ крови пациентов с БА, ДСГ и группы сравнения получено не было (таблица 7).

Таблица 7 - Площадь под кривой окислительной модификации белков пМЯЛ (у.е./г белка)

	Спонтанная ОМБ			Индукцированная ОМБ (металлкатализируемая)		
	Группа сравнения	Сосудистая деменция	Болезнь Альцгеймера	Группа сравнения	Сосудистая деменция	Болезнь Альцгеймера
S АДНФГ <i>uv</i>	8,650 [4,462; 12,899]	6,258 [4,036; 10,105]	7,730 [5,052; 9,674]	10,309 [7,268; 15,329]	7,614 [4,218; 14,201]	8,627 [5,412; 13,268]
S АДНФГ <i>vs</i>	1,959 [0,965; 7,581]	1,082 [0,698; 1,598]	1,280 [0,747; 1,776]	1,960 [0,912; 6,824]	2,001 [1,036; 4,065]	1,762 [1,063; 3,576]
S КДНФГ <i>uv</i>	2,209 [1,012; 7,482]	1,456 [0,714; 2,016]	1,277 [0,836; 1,929]	2,699 [1,004; 6,836]	1,852 [0,984; 3,945]	2,113 [1,335; 4,003]
S КДНФГ <i>vs</i>	0,278 [0,107; 1,356]	0,324 [0,116; 0,450]	0,205 [0,118; 0,318]	0,344 [0,103; 1,175]	0,478 [0,204; 0,789]	0,299 [0,167; 1,633]
S ОМБ	11,737 [5,130; 20,838]	9,120 [6,017; 14,331]	10,458 [6,839; 13,687]	15,777 [8,212; 28,951]	11,945 [6,465; 19,369]	12,802 [7,977; 23,430]

*Примечание: uv – уровень карбонильных производных, измеренных в спектре ультрафиолетового излучения (нейтральный характер);*

*vs – уровень карбонильных производных, измеренных в спектре видимого излучения (основной характер);*

Индукцированное окисление статистически незначительно повысило уровень ОМБ в пМЯЛ всех исследуемых групп. Однако доля кетонных производных несколько выше у пациентов с ДСГ по отношению к группе сравнения (рисунок 31).

Стоит отметить, что окислительный стресс является одним из патогенетических звеньев не только БА, но и ДСГ. При деменции сосудистого происхождения проницаемость ГЭБ существенно повышена [88, 145, 248], маркеры ОС, повреждения эндотелия и активации астроцитов присутствуют в системном кровотоке [129, 154, 251].

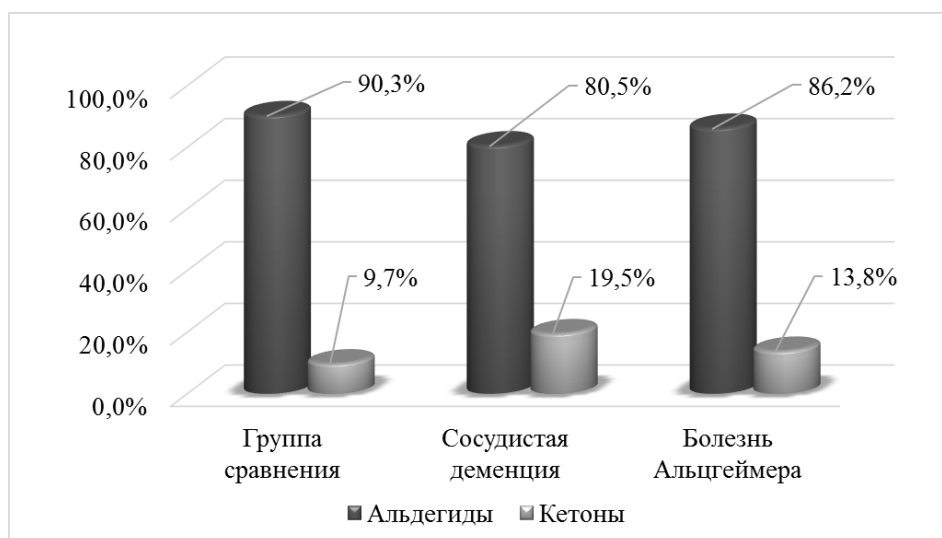


Рисунок 31 - Доля альдегидных и кетонных производных спонтанной ОМБ пМЯЛ

Степень выраженности ОС в пМЯЛ не является прогностическим или маркерным показателем, однако доказывает вовлеченность клеток крови в комплекс патогенетических процессов, имеющих место при ДСГ.

### 3.2.3 Уровень окислительной модификации белков моноядерных лейкоцитов

При измерении спонтанной ОМБ в МЯЛ обнаружено значительное повышение общего уровня карбонильных производных в группе БА по сравнению с ДСГ и группой сравнения, в основном за счет увеличения АДНФГ нейтрального характера (таблица 8). Статистически достоверно повышен и уровень индуцированной (металл-катализируемой) ОМБ в данной фракции лейкоцитов пациентов с БА относительно группы сравнения.



Таблица 8 - Площадь под кривой окислительной модификации белков МЯЛ  
(у.е./г белка) (Me [min; max])

	Спонтанная ОМБ			Индукцированная ОМБ (металлкатализируемая)		
	Группа сравнения	Сосудистая деменция	Болезнь Альцгеймера	Группа сравнения	Сосудистая деменция	Болезнь Альцгеймера
S АДНФГ <i>uv</i>	11,45 [6,79; 15,70]	12,10 [8,35; 14,33]	15,32 [10,35; 16,08]	12,18 [8,17; 28,91]	13,34 [9,36; 26,39]	<b>22,64**</b> [16,48; 34,55]
S АДНФГ <i>vs</i>	2,39 [1,05; 5,91]	1,89 [0,96; 2,69]	2,91 [2,04; 3,23]	3,33 [2,33; 10,64]	2,68 [1,04; 8,37]	4,30 [3,01; 9,88]
S КДНФГ <i>uv</i>	3,37 [1,97; 6,69]	2,53 [1,04; 6,63]	3,30 [2,05; 3,53]	4,14 [2,33; 9,09]	3,33 [1,97; 11,36]	5,77 [3,67; 12,13]
S КДНФГ <i>vs</i>	0,42 [0,20; 1,15]	0,79 [0,24; 1,37]	0,52 [0,35; 0,59]	0,53 [0,13; 2,27]	0,99 [0,69; 2,33]	0,64 [0,45; 0,78]
S ОМБ	16,98 [7,33; 36,32]	17,31 [12,37; 23,37]	<b>22,14*</b> [14,80; 23,25]	19,79 [10,04; 27,18]	20,33 [12,36; 30,36]	<b>37,43**</b> [24,46; 48,34]

Примечание: *uv* – уровень карбонильных производных, измеренных в спектре ультрафиолетового излучения (нейтральный характер);

*vs* – уровень карбонильных производных, измеренных в спектре видимого излучения (основной характер);

\*- статистически достоверное отличие уровня спонтанной ОМБ группы наблюдения (БА) по отношению к группе сравнения,  $p < 0,05$ .

\*\* - статистически достоверное отличие уровня индуцированной ОМБ группы наблюдения (БА) по отношению к группе сравнения,  $p < 0,05$ .

В отличие от плазмы крови, в данной фракции лейкоцитов произошло повышение доли альдегидных производных нейтрального характера. Процентное соотношение альдегидных и кетонных производных спонтанной ОМБ МЯЛ равноценны во всех трех группах (рисунок 32).

Wojsiat et al. обнаружили, что АФК способны атаковать полиненасыщенные жирные кислоты липидных бислоев МЯЛ, что приводит к образованию реактивных альдегидов, среди которых одним из самых токсичных является 4-гидрокси-2-ноненаль.

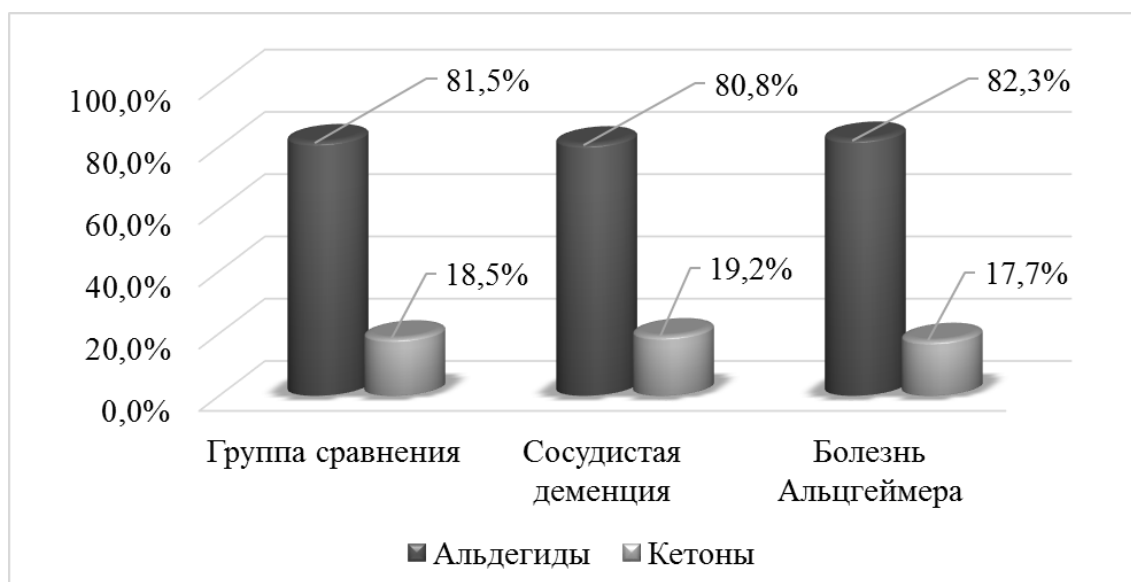


Рисунок 32 - Доля альдегидных и кетонных производных спонтанной ОМБ МЯЛ

Когда белки реагируют с 4-гидрокси-2-ноненалем, это может привести к образованию стабильных ковалентных аддуктов с остатками цистеина, лизина и гистидина. Эти маркеры окисления альдегида и белка, такие как карбонилы белка и 3-нитротирозин, были значительно повышены в лимфоцитах при БА [195, 229].

### 3.2.4 Оценка резервно-адаптационного потенциала

Оценить уровень спонтанной и индуцированной ОМБ можно отдельно, но наиболее информативно параллельное измерение этих показателей. Принимая результат уровня индуцированной ОМБ за 100%, можно найти отношение «спонтанная ОМБ/индуцированная ОМБ», что отражает резервно-адаптационный потенциал (РАП), и показывает, как много накопилось дополнительных альдегидных и кетонных производных при добавлении в реакционную среду окислительной смеси [60].

Трактовка значения РАП в литературе неоднозначна. Ряд авторов считает, что чем меньше доля спонтанного окисления в индуцированном, тем выше резервно-адаптационный потенциал [13]. По мнению других авторов, низкий процент спонтанного окисления в индуцированном отражает падение РАП,

снижение резервов физиологической защиты организма от свободных радикалов [17, 29].

Оценка доли спонтанной ОМБ в индуцированной в плазме крови при БА показала существенное снижение РАП. На это указывает значительное увеличение содержания АДНФГ нейтрального характера и КДНФГ основного характера при индуцированном окислении (таблица 9). Полученные результаты можно расценивать как существенное истощение резервных возможностей антиоксидантных систем плазмы крови пациентов с БА.

Таблица 9 – Доля АДНФГ и КДНФГ спонтанной ОМБ в АДНФГ и КДНФГ индуцированной ОМБ (%)

		АДНФГ		КДНФГ	
		нейтрального характера	основного характера	нейтрального характера	основного характера
Плазма	Болезнь Альцгеймера	14,6**	39,2	46,7	29,7*
	Сосудистая деменция	45,3	18,7**	34,3	13,3**
	Группа сравнения	97,5	38,5	55,9	45,9
пМЯЛ	Болезнь Альцгеймера	83,2	53,1*	59,4*	47,1*
	Сосудистая деменция	82,2	54,1*	78,6	67,8
	Группа сравнения	90,7	84,7	91,6	86,2
МЯЛ	Болезнь Альцгеймера	61,8*	59,6*	54,6*	75,1
	Сосудистая деменция	90,7	70,6	76,0	79,8
	Группа сравнения	83,8	82,1	83,7	80,0

Примечание:

\*- статистически достоверное отличие групп наблюдения (БА, ДСГ) по отношению к группе сравнения,  $p < 0,05$ .

\*\* - статистически достоверное отличие групп наблюдения (БА, ДСГ) по отношению к группе сравнения,  $p < 0,01$ .

Сходная картина прослеживается и у пациентов с ДСГ: РАП плазмы крови снижен, что указывает на значительную выраженность ОС и истощение антиоксидантных систем.

Оценка РАП пМЯЛ при БА и ДСГ также свидетельствует об истощении резервов физиологической защиты клеток от свободных радикалов, так как существенно возрастает доля АДНФГ основного характера (при БА и ДСГ) и КДНФГ как нейтрального, так и основного характера при БА (таблица 9).

Анализ РАП МЯЛ выявил следующее: при металл-катализируемом окислении существенно возрастает доля АДНФГ нейтрального и основного характера, а также КДНФГ нейтрального характера у пациентов с БА (таблица 9).

### **3.2.5 Оценка уровня окислительной модификации белков в динамике болезни Альцгеймера**

Степень выраженности окислительного стресса растет с возрастом, что является неизбежным процессом при старении организма. Однако, у пациентов с течением БА накопление продуктов ОС является не только следствием естественных процессов старения, но и результатом метаболических изменений, сопровождающих НДЗ [83]. Некоторые экспериментальные подходы предполагают, что ОС является фактором конвергенции, который приводит ко многим другим изменениям, связанным с БА [149].

На самых ранних, доклинических стадиях, у пациентов с БА уже определяется измененный уровень показателей, отражающих выраженность ОС: повышена активность СОД и уровень МДА, изменена активности NO-синтазы [110]. В исследовании Song et al. была обнаружена прямая корреляция между уровнем Аβ в плазме крови и степенью выраженности окислительного стресса, увеличивающегося с течением заболевания [207].

Это согласуется с результатами, полученными в ходе настоящего исследования (рисунок 33).

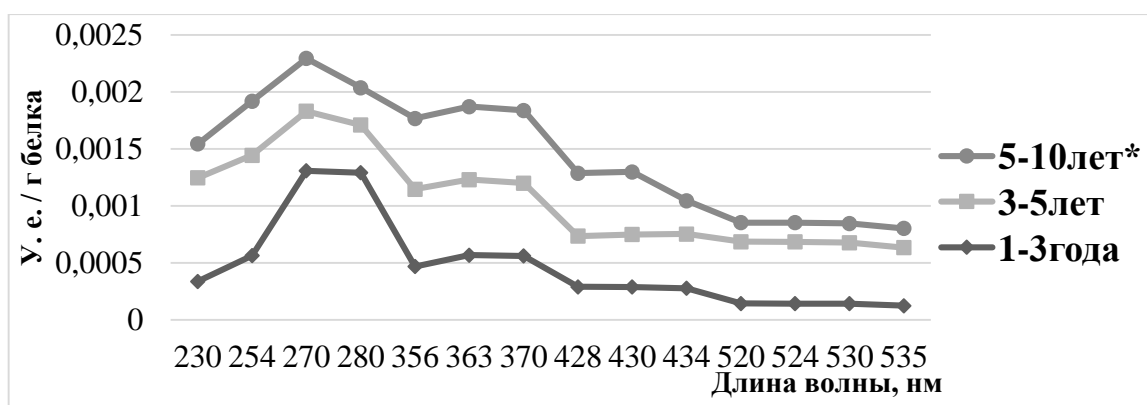


Рисунок 33 - Зависимость степени выраженности уровня окислительной модификации белков плазмы крови от длительности течения болезни Альцгеймера

\* - статистически достоверное отличие уровня ОМБ группы 5-10 лет по отношению к группе 1-3 года,  $p < 0.05$

У пациентов с длительным течением заболевания (5-10 лет) суммарный уровень ОМБ плазмы существенно превышает таковой в группе с длительностью БА 1-3 года ( $p < 0.05$ ). Причем наиболее существенный вклад в нарастание уровня ОМБ с течением заболевания вносят именно альдегидные и кетонные производных нейтрального характера, в то время как доля дериватов основного характера возрастает менее интенсивно.

Увеличение степени выраженности ОС с течением БА наблюдается и в пМЯЛ пациентов (рисунок 34, таблица 10).

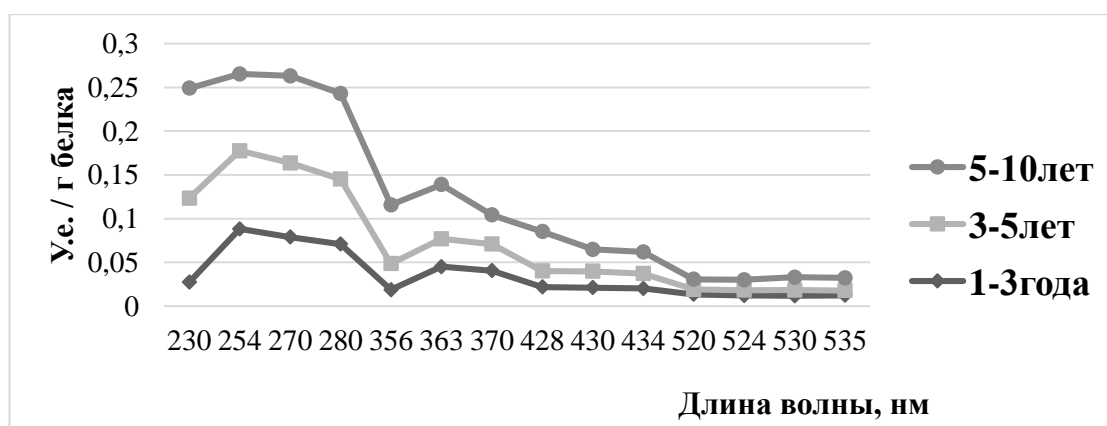


Рисунок 34 - Зависимость степени выраженности уровня окислительной модификации белков полиморфноядерных лейкоцитов от длительности течения болезни Альцгеймера

Также, как и в плазме крови, доля карбонильных производных ОМБ нейтрального характера превалирует над таковыми основного характера.

Течение БА не сопровождается существенным повышением уровня ОМБ в МЯЛ (рисунок 35, таблица 10). Вероятно, это связано с активизацией работы антиоксидантных систем этих клеток крови, частичной адаптацией их к постепенному нарастанию ОС, который неизбежно усиливается при прогрессировании заболевания. Недавние исследования показали, что повышенная восприимчивость к ОС лимфоцитов у пациентов с БА коррелирует с тяжестью деменции [221].

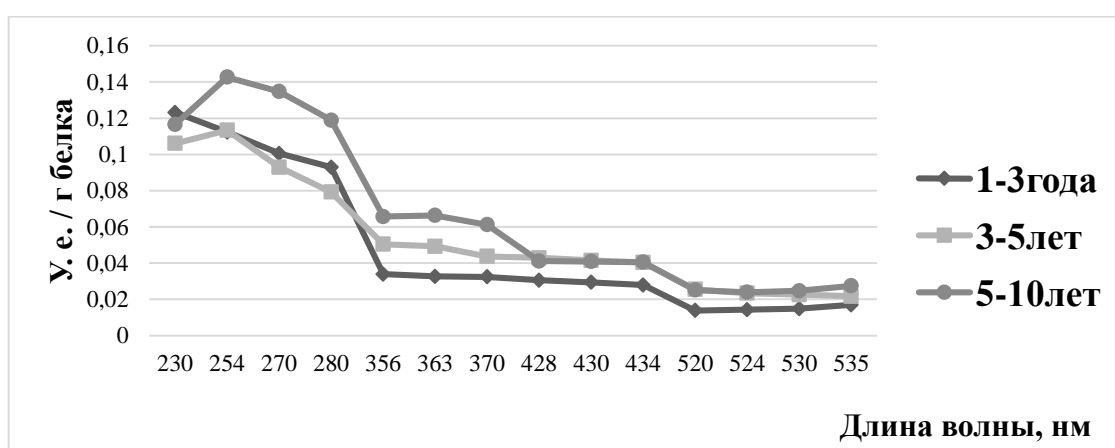


Рисунок 35 - Зависимость степени выраженности уровня окислительной модификации белков моноядерных лейкоцитов от длительности течения болезни Альцгеймера

Таблица 10 - Суммарный уровень накопления продуктов окислительной модификации белка в лейкоцитах крови пациентов с различной длительностью болезни Альцгеймера (у.е. / г белка) (Me; [Q1; Q3])

Длительность болезни Альцгеймера	пМЯЛ	МЯЛ
<b>1-3 года</b>	0,47 [0,23; 0,68]	0,67 [0,42; 0,90]
<b>3-5 лет</b>	0,49 [0,24; 0,68]	0,75 [0,40; 0,98]
<b>5-10 лет</b>	0,70 [0,36; 0,82]	0,92 [0,75; 1,02]

С течением БА существенно снижается РАП плазмы крови (рисунок 36). У пациентов с длительным течением БА (5-10 лет) РАП в 4 раза ниже, чем у пациентов с начальной стадией БА (1-3 года) (46,7% и 11,4% соответственно,  $p=0.002$ ). Это подтверждает истощение адапционно-приспособительных возможностей плазмы крови при БА, вероятно, в результате существенного снижения работы антиоксидантных систем организма.

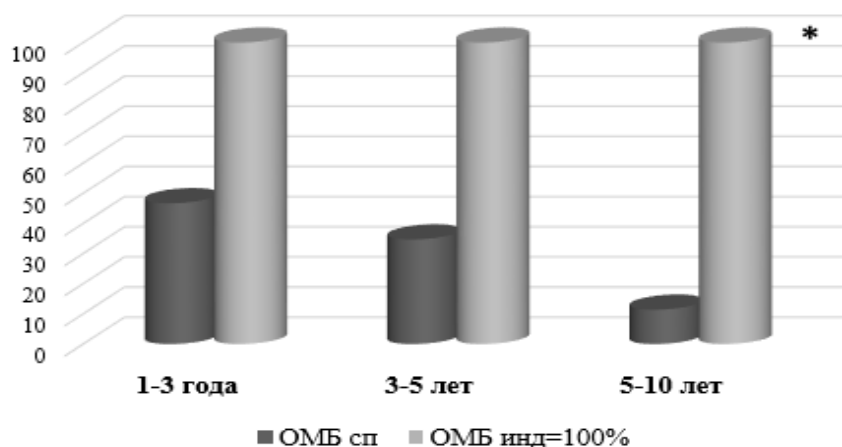


Рисунок 36 – Динамика изменения РАП плазмы крови с течением БА

\* - статистически достоверное отличие РАП группы 5-10 лет по отношению к группе 1-3 года,  $p=0.002$

РАП пМЯЛ не имеет статистически достоверных отличий в группах с различной длительностью течения БА (рисунок 37). Это может быть связано с непродолжительным сроком жизни гранулоцитарных лейкоцитов (4-5 часов в периферической крови, 4-5 суток в тканях), а также особым статусом прооксидантных процессов: генерация АФК является одним из механизмов проявления защитного действия этих лейкоцитов в отношении разрушения фагоцитированных частиц и микробных клеток.

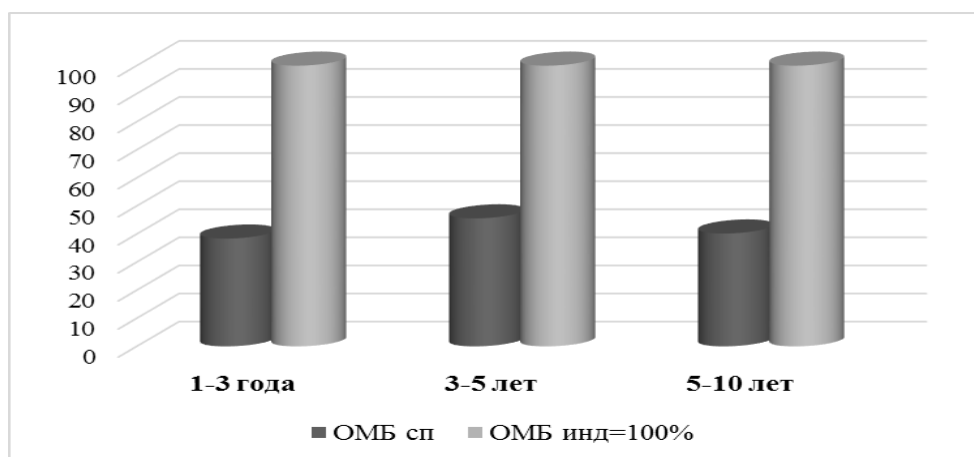


Рисунок 37 - Динамика изменения РАП пМЯЛ с течением БА

Продолжительность существования МЯЛ несколько выше – от нескольких месяцев до нескольких лет. Динамика изменения РАП в МЯЛ не имеет статистической достоверности, однако наблюдается следующая тенденция: у пациентов с длительностью течения БА 5-10 лет РАП МЯЛ в 1,5 раза ниже, чем у пациентов с начальной стадией (60,9% и 43,0% соответственно) (рисунок 38). Способность клеток противостоять окислительному стрессу уменьшается с течением заболевания.

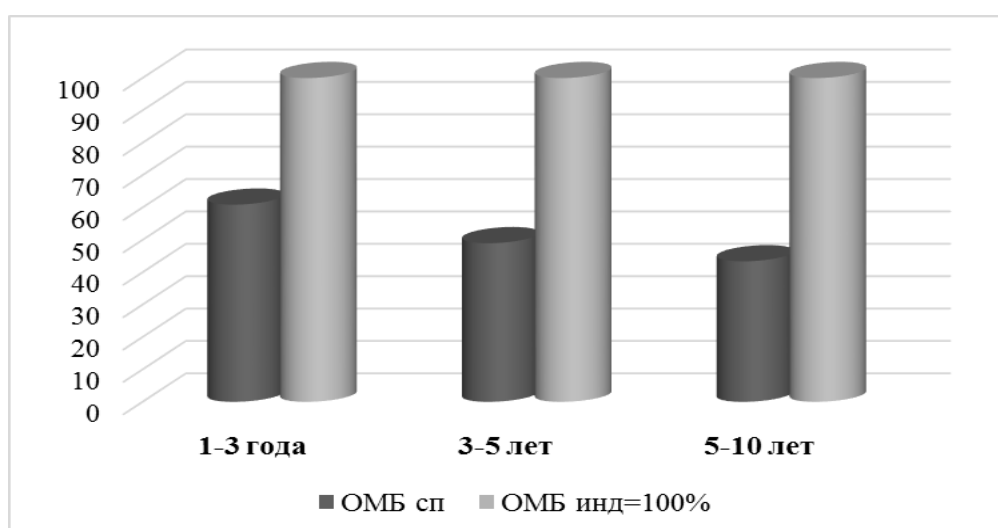


Рисунок 38 – Динамика изменения РАП МЯЛ с течением БА



При анализе степени выраженности спонтанной и индуцированной ОМБ в плазме и лейкоцитах в зависимости от тяжести деменции были получены данные, представленные в таблице 11.

Таблица 11 – Суммарный уровень спонтанной и индуцированной ОМБ ( $S_{\text{ОМБ}}$ ) плазмы крови и лейкоцитов при болезни Альцгеймера в зависимости от тяжести деменции (у.е./г белка)

	Плазма		пМЯЛ		МЯЛ	
	ОМБ <sub>сп</sub>	ОМБ <sub>инд</sub>	ОМБ <sub>сп</sub>	ОМБ <sub>инд</sub>	ОМБ <sub>сп</sub>	ОМБ <sub>инд</sub>
<b>Умеренная деменция</b>	0,01	0,02	0,74	0,78	0,71	1,80
<b>Тяжелая деменция</b>	0,01	0,03	0,85	0,92	0,96	2,17

Уровень карбонильных производных в плазме крови при умеренной и тяжелой деменции статистически не отличается, однако у пациентов с более выраженными дементными нарушениями отмечается большее нарастание ОМБ<sub>инд</sub>. В пМЯЛ при тяжелой деменции уровень ОМБ<sub>сп</sub> всего на 13% выше, чем при легкой деменции. Также не существенно отличается нарастание уровней ОМБ<sub>инд</sub> в этой фракции лейкоцитов в зависимости от тяжести деменции. А в МЯЛ пациентов с тяжелой деменцией уровень ОМБ<sub>сп</sub> на 26% выше, чем при умеренной.

При оценке РАП плазмы и фракционированных лейкоцитов крови при БА в зависимости от тяжести деменции, были выявлены закономерности, аналогичные таковым при различной продолжительности заболевания: более выражено истощение РАП плазмы и МЯЛ, в то время как РАП пМЯЛ практически не отличается у больных с умеренной и тяжелой деменцией (рисунок 39).

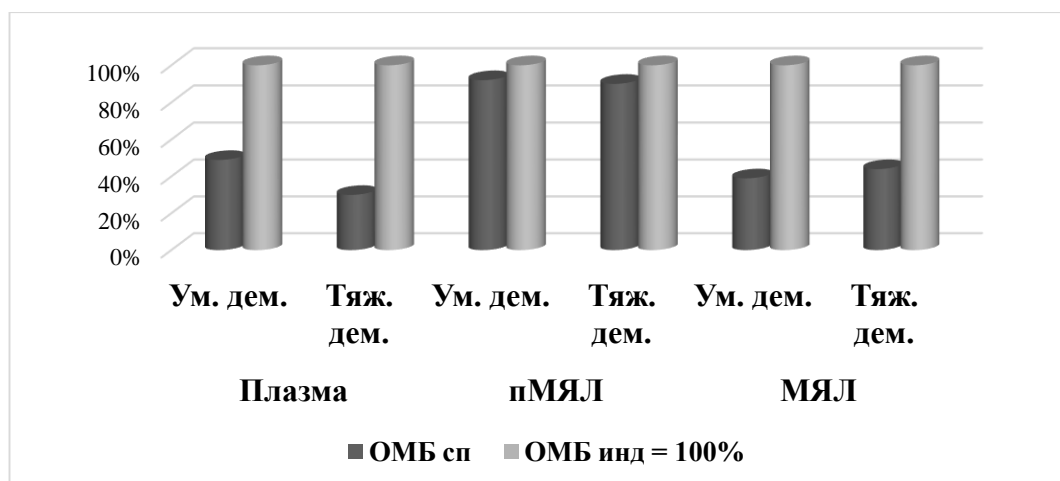


Рисунок 39 – РАП плазмы крови и лейкоцитов пациентов с умеренной и тяжелой деменцией, вызванной болезнью Альцгеймера

Таким образом, развитие ОС с течением БА сказывается на увеличении доли карбонильных производных белков плазмы крови и МЯЛ.

### **3.2.6 Взаимосвязь уровня окислительной модификации белков и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ при болезни**

#### **Альцгеймера и деменции сосудистого генеза**

Кроме изолированной оценки степени выраженности ОС путем определения уровня ОМБ и активности лизосомальных протеиназ, интерес исследователей вызывает выявление корреляционных связей между двумя этими показателями, так как два этих процесса взаимосвязаны патогенетически и могут как отягощать, так и нивелировать друг друга. Так, например, обнаружена взаимосвязь между окислительным карбонилированием белков и активностью катепсина L при ишемии [19], установлено, что в ходе старения клеток снижается активность катепсина D и одновременно повышается интенсивность карбонилирования среднемолекулярных олигопептидов [20, 45]. Доказано, что повышение проницаемости мембран лизосом, а следовательно и повышение их активности, может быть связано с ОМБ и липидов, входящих в состав лизосомальных мембран [47, 91]. Кроме того, продукты ОМБ могут потенцировать агрегацию белков и олигопептидов [59]. Вполне вероятно, что

окисленные белки являются промежуточными продуктами в образовании амилоидных фибрилл при БА, в результате термодинамической нестабильности и частичного разрушения третичной структуры белка образуются дериваты, легко подвергающиеся агрегации [225]. На экспериментальной модели клеточных культур, продуцирующих A $\beta$ 42 *in vitro*, показано, что чем выше степень ОС, тем интенсивнее протекает агрегация олигопептидов, но при этом активизируются механизмы утилизации и секвестрации поврежденных молекул, в том числе протеазы [96, 211].

В плазме крови пациентов с БА статистически достоверных взаимосвязей между активностью изучаемых катепсинов и степенью выраженности ОМБ не отмечалось (таблица 12).

Таблица 12 - Взаимосвязь уровня ОМБ и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ пациентов с болезнью Альцгеймера  
(Коэффициент Спирмена, r; n=25)

Активность лизосомальной протеиназы	Площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ				
	S <sub>аднФгн</sub>	S <sub>аднФго</sub>	S <sub>кднФгн</sub>	S <sub>кднФго</sub>	S <sub>общ</sub>
<b>Плазма</b>					
Катепсин В	0,37	-0,09	-0,09	-0,11	0,20
Катепсин L	0,31	-0,04	-0,12	-0,01	0,29
Катепсин Н	0,28	-0,31	-0,38	-0,28	0,06
<b>пМЯЛ</b>					
Катепсин В	-0,30	-0,22	-0,17	-0,25	-0,30
Катепсин L	0,04	0,05	0,02	0,06	-0,09
Катепсин Н	<b>-0,58**</b>	-0,18	<b>-0,45*</b>	-0,24	<b>-0,46*</b>
<b>МЯЛ</b>					
Катепсин В	-0,13	0,24	0,03	-0,12	0,04
Катепсин L	0,04	0,33	0,20	0,19	0,10
Катепсин Н	<b>-0,40*</b>	-0,15	-0,33	-0,10	-0,28

Примечание: \* - p<0.5

---

\*\* -  $p < 0.01$

При анализе корреляционных связей между изучаемыми показателями в пМЯЛ при БА обнаружена отрицательная взаимосвязь между активностью катепсина Н и уровнем первичных ( $S_{\text{АДНФГн}}$ ) и вторичных ( $S_{\text{КДНФГн}}$ ) маркеров окислительного повреждения белков ( $r = -0.58$ ,  $p < 0.01$  и  $r = -0.45$ ,  $p < 0.05$  соответственно) клеток крови, а также общим уровнем ОМБ ( $r = -0.45$ ,  $p < 0.05$ ) (таблица 12).

В МЯЛ пациентов в БА также выявлена отрицательная корреляция между уровнем  $S_{\text{АДНФГн}}$  и активностью катепсина Н ( $r = -0.40$ ,  $p < 0.05$ ) (таблица 12).

Протеолиз является одним из возможных механизмов защиты клеток от накопления продуктов ОМБ, своеобразным регулятором протеинового метаболизма клетки. Лизосомальные ферменты обеспечивают защитную функцию в условиях развития ОС [17, 19]. В то же время, важным следствием ОС является окислительная модификация молекул различных ферментов. Так, например, воздействие альдегидов вызывает инактивацию важнейшего мембранного транспортера  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазы}$ , белков-транспортеров глюкозы в тканях головного мозга, что приводит к развитию гипохроэнергетического состояния и нейродегенеративным изменениям. Окислительная модификация протеин-дисульфидизомеразы и шаперона Hsp90 нейронов приводят к их инактивации и нарушению контроля фолдинга протеинов головного мозга [40].

Вклад катепсина Н в процесс деградации поврежденных в результате ОС клеточных структур особенно важен, так как это единственная лизосомальная аминопептидаза, обнаруженная также в цитоплазме, клеточных мембранах и межклеточном пространстве [117, 158].

Выявленная отрицательная корреляция между уровнем активности катепсина Н и степенью выраженности ОМБ в пМЯЛ и МЯЛ при БА свидетельствует о вовлечении данной протеиназы в деградацию продуктов, накопленных в результате активации ОС. В обеих фракциях лейкоцитов при БА

активность фермента выше, чем в группах сравнения (рисунки 23, 24). Однако и активность катепсина В в лейкоцитах при БА выше, чем у пациентов без нейродегенерации, при этом достоверной корреляционной связи с уровнем ОМБ не обнаружено.

Вовлеченность катепсина Н в метаболизм лимфоцитов при различных патологиях не вызывает сомнения. Так, было показано, что повышенная экспрессия катепсина Н в инфильтрирующих лимфоцитах вызывает значительную деградацию структур межклеточного матрикса при аутоиммунных воспалительных заболеваниях. Исследование базальноклеточных карцином выявило, что повышенная экспрессия гена катепсина Н и избыточная протеолитическая активность были локализованы в клетках вокруг опухолевых узлов, что может отражать активацию иммунологически компетентных клеток [158].

У пациентов группы сравнения была выявлена прямо пропорциональная связь между активностью катепсина L плазмы крови и уровнем альдегидных и кетонных производных ОМБ нейтрального характера ( $r=0.51$ ,  $p<0.01$  для АДНФГн,  $r=0.47$ ,  $p<0.05$  для КДНФГн), а также общим уровнем ОМБ ( $r=0.46$ ,  $p<0.05$ ) (таблица 13). Кроме того, в пМЯЛ пациентов без НД отмечается отрицательная корреляция между активностью катепсинов В и L и уровнем ОМБ в МЯЛ пациентов группы сравнения статистически достоверных корреляций между изучаемыми показателями выявлено не было.

Активность катепсина L в плазме крови пациентов группы сравнения значительно ниже, чем у пациентов обеих групп наблюдения (рисунок 22). Многие исследования подтверждают, что активность данного фермента в плазме у здоровых лиц, как правило, невысока, и возрастает при многих патологиях (злокачественные опухоли различных локализаций, сосудистые нарушения, эндокринные заболевания) [111, 190]. Выявленная прямо пропорциональная зависимость между активностью катепсина L и уровнем ОМБ может быть связана с тем, что сам фермент подвергается окислительной модификации.

Таблица 13 - Взаимосвязь уровня ОМБ и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в группе сравнения

(Коэффициент Спирмена, r; n=25)

Активность лизосомальной протеиназы	Площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ				
	S <sub>АДНФГ<sub>н</sub></sub>	S <sub>АДНФГ<sub>о</sub></sub>	S <sub>КДНФГ<sub>н</sub></sub>	S <sub>КДНФГ<sub>о</sub></sub>	S <sub>общ</sub>
<b>Плазма</b>					
Катепсин В	0,32	-0,25	-0,03	-0,16	0,21
Катепсин L	<b>0,51**</b>	0,29	<b>0,47*</b>	-0,01	<b>0,46*</b>
Катепсин Н	0,06	-0,10	0,10	-0,28	-0,09
<b>пМЯЛ</b>					
Катепсин В	<b>-0,54**</b>	<b>-0,45*</b>	<b>-0,48*</b>	<b>-0,48*</b>	<b>-0,54**</b>
Катепсин L	-0,33	<b>-0,43*</b>	<b>-0,43*</b>	<b>-0,49*</b>	-0,33
Катепсин Н	-0,20	-0,12	-0,20	-0,01	-0,20
<b>МЯЛ</b>					
Катепсин В	0,15	0,32	0,34	0,37	0,26
Катепсин L	-0,09	0,37	-0,19	0,33	0,05
Катепсин Н	-0,26	0,28	-0,37	-0,37	-0,15

Примечание: \* - p<0.5

\*\* - p<0.01

Карбонильные производные белков образуются, в значительной степени, за счет модификации аминокислотных радикалов. Наиболее чувствительными к окислительному повреждению являются остатки гистидина, аргинина, цистеина, метионина и лизина. Цистеиновые радикалы занимают в этом ряду особое положение, так как окисление сульфидной группы может привести к образованию различных продуктов: дисульфидных сшивок, глутатионтиолов, сульфинозой и сульфоновой кислот [94]. В структуре катепсина L остатки цистеина играют ключевую роль в формировании активного центра (Cys25, Cys22, Cys63), а также соединении двух субъединиц фермента за счет дисульфидных мостиков [91].

Поэтому окислительный стресс может существенно сказаться на функционировании фермента.

В группе пациентов с деменцией сосудистого происхождения в плазме крови и МЯЛ не выявлено статистически достоверных корреляций между активностью лизосомальных цистеиновых протеиназ и уровнем ОМБ, в то время как в пМЯЛ отмечается схожая с группой сравнения тенденция: чем выше активность катепсина В, тем ниже уровень АДНФГн ( $r=-0.39$ ,  $p<0.05$ ) и суммарный уровень ОМБ ( $r=-0.41$ ,  $p<0.05$ ); чем выше активность катепсина L, тем ниже уровень альдегидных и кетонных дериватов основного характера ( $r=-0.39$ ,  $p<0.05$ ) (таблица 14).

Таблица 14 - Взаимосвязь уровня ОМБ и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ пациентов с сосудистой деменцией  
(Коэффициент Спирмена,  $r$ ;  $n=25$ )

Активность лизосомальной протеиназы	Площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ				
	$S_{\text{АДНФГн}}$	$S_{\text{АДНФГ о}}$	$S_{\text{КДНФГ н}}$	$S_{\text{КДНФГ о}}$	$S_{\text{общ}}$
<b>Плазма</b>					
Катепсин В	0,18	0,20	-0,07	-0,19	0,16
Катепсин L	0,27	0,19	0,38	-0,01	0,30
Катепсин Н	0,14	-0,15	0,17	-0,18	0,19
<b>пМЯЛ</b>					
Катепсин В	<b>-0,39*</b>	-0,25	-0,27	-0,28	<b>-0,41*</b>
Катепсин L	-0,23	<b>-0,39*</b>	-0,14	<b>-0,39*</b>	-0,32
Катепсин Н	-0,10	-0,02	-0,07	-0,09	-0,16
<b>МЯЛ</b>					
Катепсин В	0,24	0,12	0,14	0,16	0,16
Катепсин L	0,09	0,25	0,29	0,30	0,15
Катепсин Н	0,06	0,21	-0,17	-0,19	-0,13

Примечание: \* -  $p<0.5$

\*\* -  $p<0.01$

Выявленная закономерность свидетельствует о существенном вкладе катепсинов В и L в деградацию и утилизацию продуктов ОМБ в пМЯЛ. У пациентов же с БА, вероятно, протективное действие данных протеаз снижено. Это может быть результатом окислительной модификации самих белковых молекул энзимов.

Установлено, что ОС при БА сопряжен с интенсификацией апоптоза нейронов, в регуляции которого принимают участие АФК [12, 42]. Апоптоз, вызванный АФК [97, 214, 238] и сопровождающийся повышением проницаемости лизосомальной мембраны, связан с выходом катепсина В в цитозоль, освобождением митохондриального цитохрома с и активацией системы каспаз [42, 142]. Такой вид апоптоза характерен для клеток нейробластомы [238], а также наблюдается при апоптозе нейтрофилов, вызванном бактериями [142].

### 3.3 Оценка степени выраженности эндогенной интоксикации при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза

Суммарный уровень ВНиСММ в плазме крови и пМЯЛ пациентов обеих групп наблюдения статистически не отличается от такового в группе сравнения (таблица 15, рисунки 40, 41).

Таблица 15 - Суммарный уровень веществ низкой и средней молекулярной массы (усл.ед.)

	Болезнь Альцгеймера	Сосудистая деменция	Группа сравнения
	n=25	n=25	n=25
Плазма крови	155,70	152,27	143,56
МЯЛ	<b>15,43**</b>	<b>2,82*</b>	1,42
пМЯЛ	5,33	3,85	4,16

*Примечание:* \* отмечены статистически достоверные различия групп наблюдения от группы сравнения,  $p < 0,05$

\*\* -  $p < 0,01$



Однако стоит отметить, что общее содержание ВНиСММ в плазме крови пациентов всех групп превышает средний уровень по популяции для соответствующей возрастной группы [18]. Полученный результат свидетельствует о широком распространении синдрома ЭИ при различных

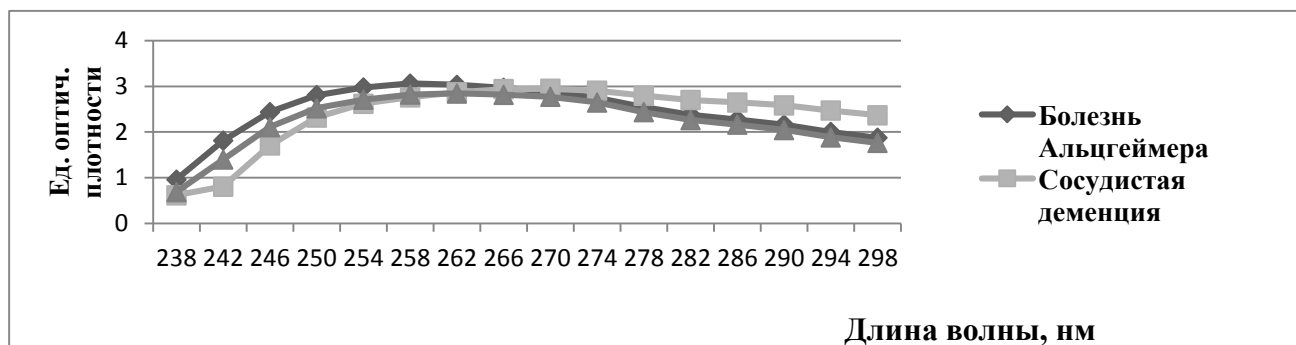


Рисунок 40 - Спектры поглощения веществ низкой и средней молекулярной массы в плазме крови

патологиях [38, 51, 67].

Несмотря на отсутствие статистических отличий в суммарном количестве ВНиСММ в пМЯЛ сравниваемых групп, обращает на себя внимание отличие в

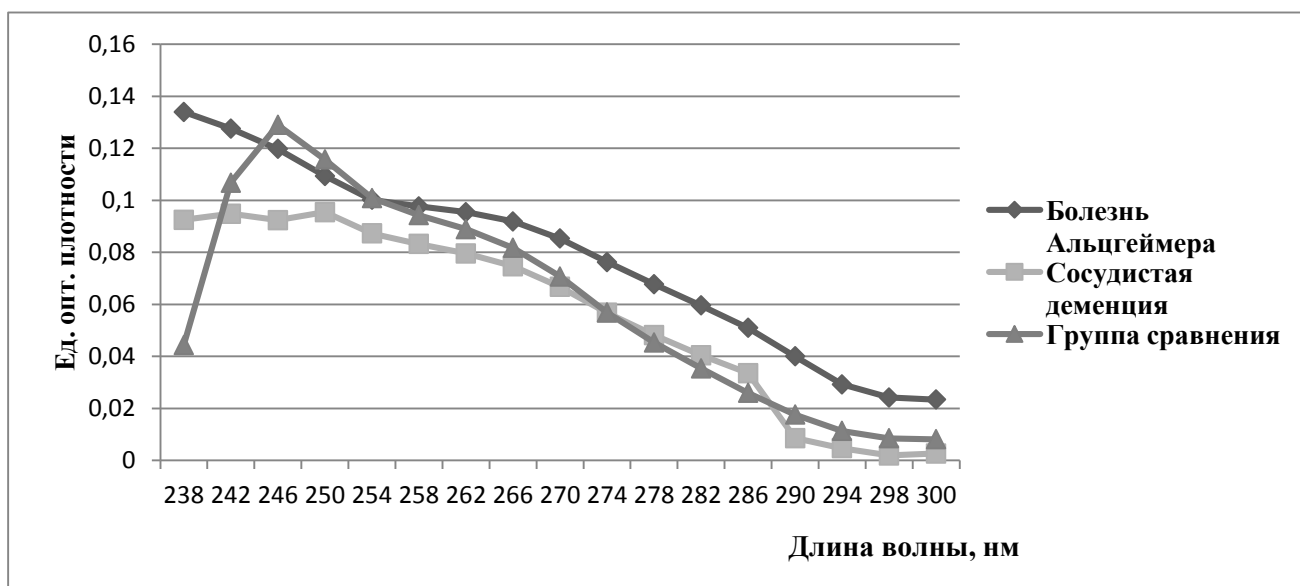


Рисунок 41 - Спектры поглощения веществ низкой и средней молекулярной массы в лизатах полиморфноядерных лейкоцитов

перераспределении спектрального поглощения различных веществ. Так, в группах наблюдения выше уровень метаболитов, поглощающих свет при длине волны 238нм (соответствует рибозиду мочевой кислоты), в то время как в группе сравнения пик поглощения приходится на 246нм (соответствует тиамину и 2,6-диаминопурины) (рисунок 41) [18].

Рибозид мочевой кислоты является промежуточным метаболитом на пути катаболизма пуриновых азотистых оснований [11]. Установлено, что мочевая кислота может усиливать окисление липопротеинов низкой плотности, инициированное пероксидными радикалами.

Прооксидантная активность мочевой кислоты зависит от многих факторов, в том числе от концентрации ионов меди: чем выше концентрация меди, тем более отчетливо выражено прооксидантное действие уратов по отношению к ЛПН [11, 175]. В тоже время мочевая кислота может проявлять антиоксидантные свойства, так как ион, образующийся при ее диссоциации, является важным акцептором свободных радикалов [175].

Уровень ВНиСММ вМЯЛ для обеих групп наблюдения оказался статистически значимо выше аналогичного показателя в группе сравнения (таблица 14, рисунок 42). У пациентов с деменцией сосудистого генеза этот

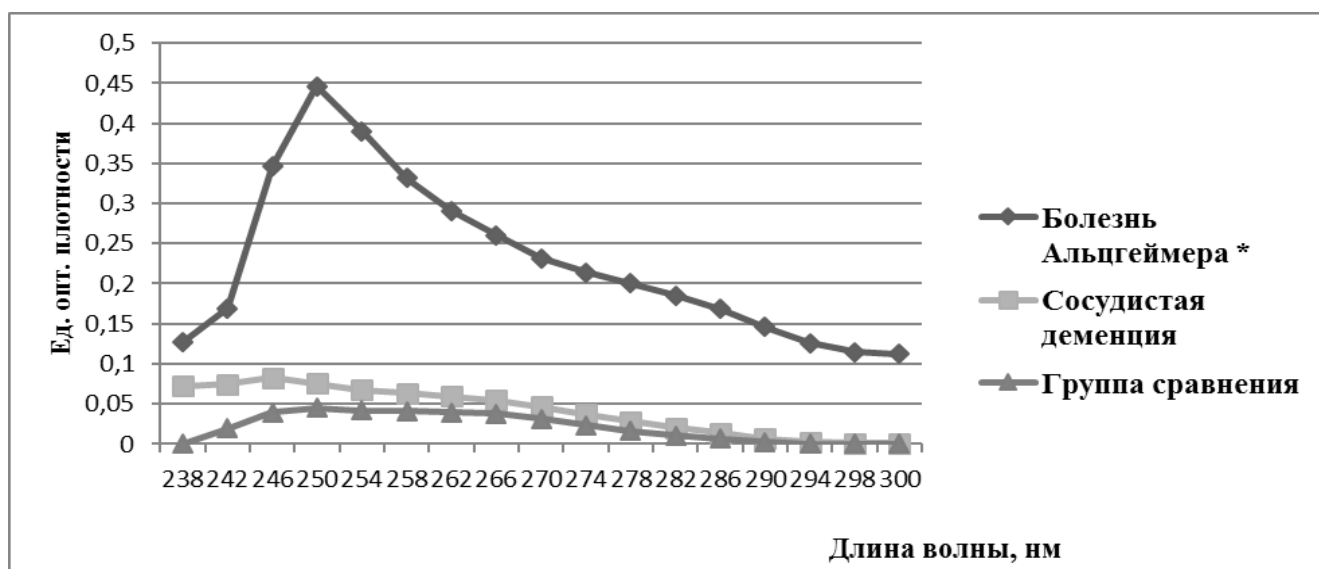


Рисунок 42 – Спектры поглощения веществ низкой и средней молекулярной массы в лизатах моноядерных лейкоцитов

\* - статистически достоверное отличие,  $p < 0,05$

показатель вдвое выше, чем у пациентов группы сравнения, в то время как при БА отмечается увеличение концентрации ВНиСММ в МЯЛ в 10,8 раз ( $p < 0,05$ ).

Как видно из графика, представленного на рисунке 42, пик поглощения ВНиСММ в МЯЛ при БА приходится на 250нм, что соответствует накоплению гипоксантина, инозина, ксантозина и их производных [18].

Вышеуказанные вещества образуются при катаболизме нуклеотидов, мономеров нуклеиновых кислот. Повышение накопления этих продуктов может быть следствием окислительной модификации нуклеиновых кислот в изучаемых клетках [66, 194, 200]. В исследовании Bradley-Whitman et al. сообщается о накоплении продуктов окислительной модификации нуклеиновых кислот в тканях головного мозга пациентов с БА различных стадий, в т. ч. ранних [191], что также подтверждает важную роль изучения метаболизма лимфоцитов как периферических маркеров нарушенного метаболизма при БА.

При анализе зависимости уровня ВНиСММ в плазме (рисунок 43) и пМЯЛ (рисунок 44) от длительности течения БА среди пациентов соответствующей группы не было выявлено статистически значимых различий.

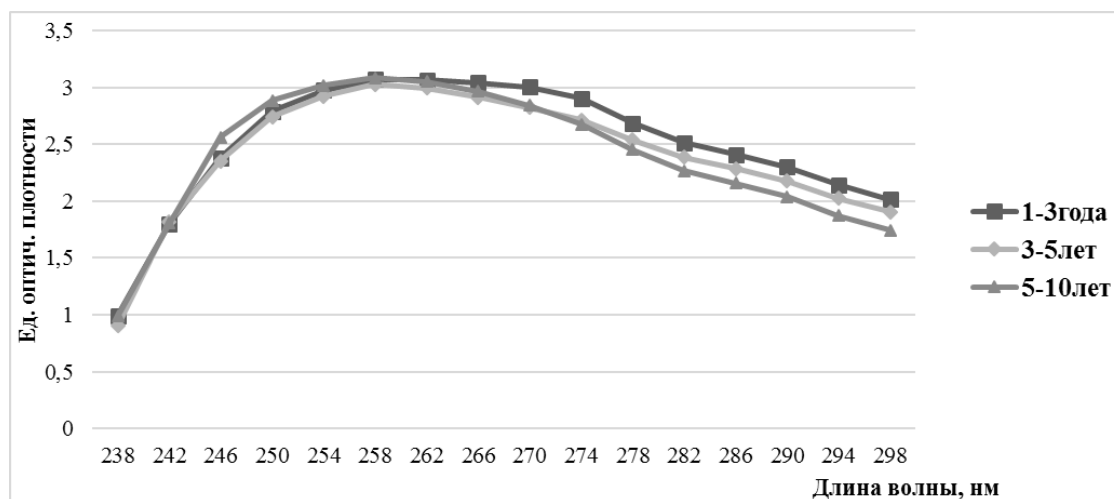


Рисунок 43 – Уровень ВНиСММ плазмы крови в динамике болезни Альцгеймера

Однако концентрация ВНиСММ в МЯЛ статистически выше у пациентов с длительностью заболевания 1-3 года ( $p < 0,05$ ) (рисунок 45).

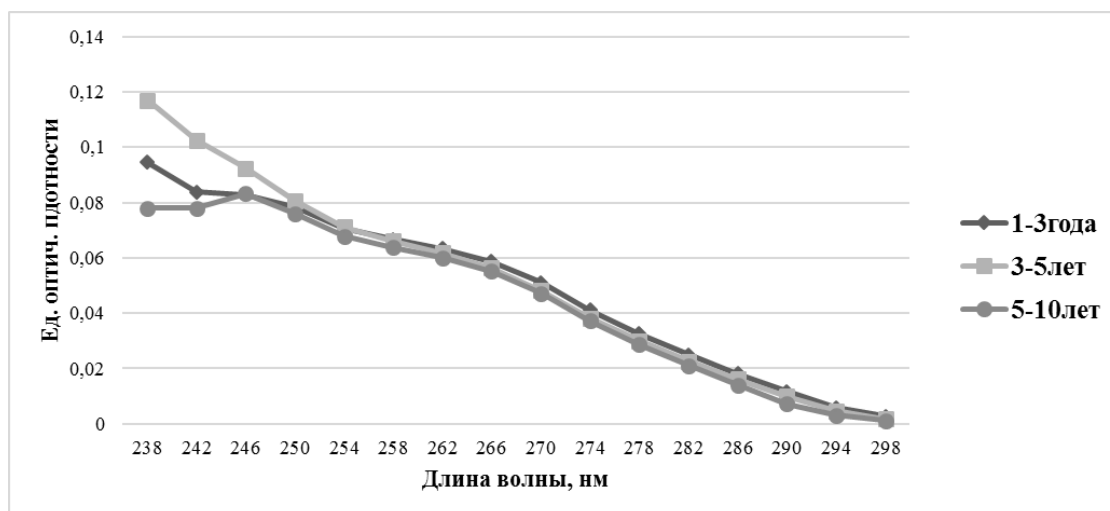


Рисунок 44 – Уровень ВНиСММ в полиморфноядерных лейкоцитах в динамике болезни Альцгеймера

Выявленная закономерность может быть связана с тем, что на начальных этапах заболевания происходит значительная активизация свободнорадикального окисления, тканевого протеолиза, что приводит к развитию синдрома ЭИ. С течением времени, вероятно, в организме активируются адаптационные детоксикационные системы: монооксигеназная, иммунная, выделительная, - что сказывается на метаболизме МЯЛ, выраженности ЭИ несколько уменьшается [30, 46].

Пик накопления ВНиСММ приходится на длины волн 254-266нм, что указывает на повышенное содержание в МЯЛ продуктов катаболизма нуклеиновых кислот (рисунок 45). АФК индуцируют гидроксирование азотистых оснований нуклеиновых кислот, например, образование 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина из дезоксигуанозина. Установлено, что при БА содержание этого метаболита в 10 раз выше, чем других окисленных оснований. Он присутствует в митохондриях и ядерной ДНК мозга пациентов с БА. Вызванное ОС повреждение ДНК приводит к нежелательному образованию сшивок ДНК-ДНК и ДНК-белок. АФК могут также модифицировать Аβ путем окисления составляющих его метионинов до соответствующих катион-радикалов, которые

инициируют цепные свободнорадикальные реакции, приводящие к агрегации Аβ [242].

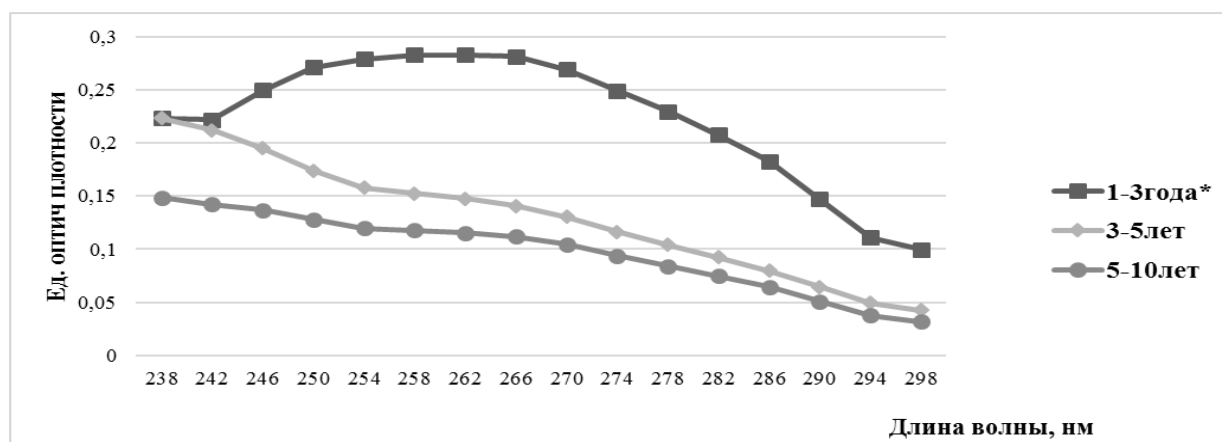


Рисунок 45 – Уровень ВНиСММ в моноядерных лейкоцитах в динамике болезни Альцгеймера

При анализе уровня накопления ВНиСММ в плазме крови у больных с БА в зависимости от степени выраженности деменции были получены результаты, представленные на рисунке 46.

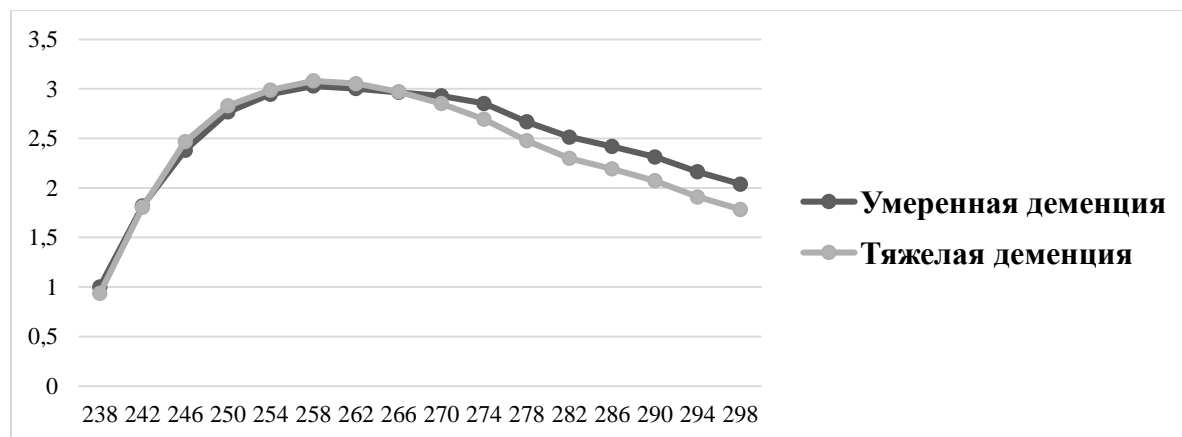


Рисунок 46 – Уровень ВНиСММ в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера в зависимости от тяжести деменции

Как длительность заболевания (рисунок 43), так и тяжесть деменции (рисунок 46) не коррелируют с уровнем ВНиСММ плазмы крови. Это свидетельствует о существенном накоплении конечных и промежуточных продуктов обмена в сверхвысоких концентрациях, продуктов нарушенного метаболизма в организме пациентов с БА на всех этапах заболевания. Вероятнее

всего, возрастает не только продукция ВНиСММ, но и снижается способность организма утилизировать их, в т. ч. за счет нарушения работы протеолитических систем.

Во фракционированных лейкоцитах, полученных от пациентов с БА, уровень ВНиСММ выше у больных с умеренной деменцией (рисунок 47). При умеренной деменции содержание ВНиСММ в пМЯЛ в 3,2 раза выше ( $p < 0,01$ ), чем при тяжелой. Аналогичная тенденция характерна и для МЯЛ: в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) уровень ВНиСММ выше у больных с умеренной степенью деменции.

Тяжелая деменция наблюдается при длительном течении заболевания (3-5 лет и более), умеренная чаще встречается на начальных этапах БА (1-3 года), реже при больших сроках болезни. Получаемая больными БА в течение долгих лет фармакотерапия, без сомнений, в той или иной степени изменяет метаболические процессы, происходящие в организме.

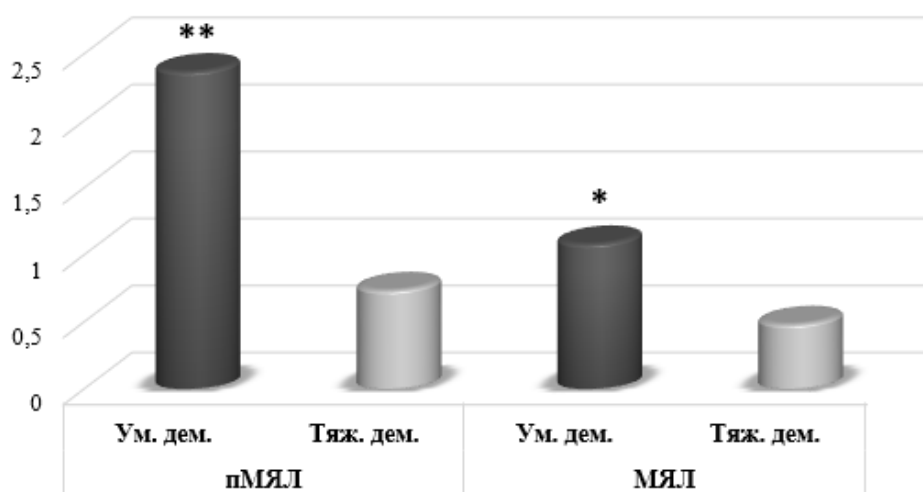


Рисунок 47 – Уровень ВНиСММ в лейкоцитах пациентов с различной степенью деменции, вызванной болезнью Альцгеймера

\* - статистически достоверное отличие,  $p < 0,05$

\*\* - статистически достоверное отличие,  $p < 0,01$

В последние годы Узбековым М.Г. с соавт. проведены многочисленные исследования по изучению метаболитов, сказывающихся на степени выраженности ЭИ при психических расстройствах, и веществ, способных противостоять их накоплению. Цилиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ) –

цитокин, принадлежащий к семейству ИЛ- 6, вырабатывается преимущественно глиальными клетками. ЦНТФ проявляет выраженные нейропротекторные свойства. В крови больных с депрессией, эпилепсией содержание этого нейротропного фактора повышено, однако он не проявляет должных защитных свойств в связи с высокой проницаемостью ГЭБ [57].

Вовлеченность цитокинов в патогенез психических заболеваний подтверждена многочисленными отечественными и зарубежными исследованиями. При шизофрении, аффективных расстройствах, болезнях зависимости, невротических расстройствах, НДЗ отмечается цитокиновый дисбаланс как в крови, так и ликворе [31]. При БА содержание ИЛ-6 в СМЖ повышено [] (Blum-Degen D. et al., 1995). Доказано активное участие ИЛ-6 в отложении А $\beta$  при БА [31]. В литературе не встречается упоминаний о содержании ЦНТФ или иных нейротропных цитокинов в крови пациентов с БА. Однако снижение выраженности ЭИ в клетках крови больных с тяжелой деменцией, по сравнению с аналогичным показателем у больных с умеренной степенью деменции, может быть следствием не только активации адаптационно-приспособительных процессов организма, но и накопления нейропротекторных молекул на фоне длительно проводимой фармакотерапии [10, 56, 57].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов патогенеза БА является одним из приоритетных направлений развития современной биохимии. Формирование единой концепции патогенеза, выявление заболевания на максимально ранних стадиях, динамическое наблюдение за течением заболевания, разработка эффективных фармакологических препаратов невозможны без выявления разнообразных метаболических отклонений, возникающих при БА. Поиск биохимических маркеров БА в тканях, легко доступных для лабораторных исследований, актуален для создания полимодальных диагностических панелей.

На сегодняшний день накоплено довольно много сведений о вкладе в патогенез БА патологического процессинга APP, формирования отложений A $\beta$  в определенных областях мозга и гиперфосфорилировании тау-протеина с образованием NTF. Однако, не вызывает сомнения, что определенный вклад в развитие НД при БА вносят и такие процессы, как окислительный стресс, следствием которого является окислительная модификация белков, липидов, нуклеиновых кислот, изменение проницаемости лизосомальных мембран и активности лизосомальных ферментов (катепсинов), развитие синдрома эндогенной интоксикации. В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение состояния системы лизосомальных цистеиновых протеиназ в плазме крови и различных фракциях лейкоцитов (МЯЛ и пМЯЛ) во взаимосвязи с окислительным карбонилированием белков и уровнем эндогенной интоксикации при болезни Альцгеймера.

Для осуществления поставленной цели были сформированы три группы пациентов. В 1 группу были включены пациенты, имеющие подтвержденный диагноз «Болезнь Альцгеймера» различной длительности. Учитывая, что перечисленные выше патологические процессы могут иметь место и у пациентов с деменцией без признаков нейродегенерации, во 2 группу были отобраны пациенты с диагнозом «Деменция сосудистого генеза», у которых потеря когнитивных навыков стала последствием перенесенной гипоперфузии тканей головного мозга. Наконец, для исключения вклада возрастных изменений, а также



сопутствующих патологий в развитие окислительного стресса и модификаций активности лизосомальных ферментов, была создана 3 группа, в которую вошли пациенты, сопоставимые по возрасту, полу, сопутствующим заболеваниям пациентам 1 группы, однако не имеющих признаков деменции и НД. Пациенты включались в исследования после добровольного информированного согласия.

В качестве материала для исследования использовались полученные от пациентов плазма крови и разделенные на фракции лейкоциты – МЯЛ и пМЯЛ. Выделение лейкоцитов проводилось методом изопикнического центрифугирования. Для разрушения плазматических и лизосомальных мембран к гомогенатам клеток добавлялся раствор тритона X-100, после чего полученные смеси подвергались трехкратному замораживанию-оттаиванию.

Полученные лизаты лейкоцитов, а также плазма крови использовались для спектрофлуориметрического определения активности трех цистеиновых катепсинов: В, L, Н (метод по Barrett и Kirschke). В основе измерения активности фермента лежит регистрация флюоресцирующего продукта реакции – 7-амидо-4-метилкумарина, образующегося при расщеплении специфических флюорогенных субстратов под действием соответствующей протеазы.

Для определения уровня ОМБ, как одного из показателей выраженности ОС в изучаемом материале, проведено спектрофотометрическое определение уровня 2,4-динитрофенилгидразонов, образовавшихся путем взаимодействия карбонильных групп окисленных аминокислотных радикалов с 2,4-динитрофенилгидразином (метод R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой). Дериваты, образовавшиеся *in vivo* и вступившие в реакцию с ДНФГ, дают представление о спонтанной ОМБ. Кроме того, аналогичное измерение проводилось после добавления к исследуемому биологическому материалу реактива Фентона (смесь раствора пероксида водорода и соли Fe), который провоцировал дополнительное образование карбонильных производных в белках (индуцированная или металл-катализируемая ОМБ). По разнице между индуцированной и спонтанной ОМБ оценивался резервно-адаптационный потенциал - способность исследуемого материала противостоять нарастающему

окислительному стрессу. Также определялись коэффициенты корреляции между такими показателями, как активность цистеиновых катепсинов В, L, Н и уровень спонтанной ОМБ.

Для определения степени выраженности синдрома эндогенной интоксикации в биологическом материале спектрофотометрически измерялся уровень веществ низкой и средней молекулярной массы.

Для определения влияния течения БА на степень выраженности изучаемых показателей, пациенты 1 группы были разделены на 3 подгруппы: с длительностью заболевания 1-3 года, 3-5 и 5-10 лет. Проанализированы соответствующие показатели с учетом этого параметра.

В ходе исследования было выявлено, что БА ассоциирована с нарастанием активности цистеиновых катепсинов В, L, Н в плазме и моноядерных лейкоцитах, а также катепсинов В и Н в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови, что может рассматриваться как один из возможных маркеров развития и диагностики заболевания. При этом в плане динамического изменения активности фермента с течением заболевания наиболее информативным оказался катепсин L: в обеих изучаемых фракциях лейкоцитов у пациентов с БА сначала отмечается нарастание активности катепсина L (подгруппа с длительностью патологии 3-5 лет), а затем снижение (у подгруппы с 5-10-летней продолжительностью) до значений, сопоставимых с пациентами начального периода БА.

Общее количество продуктов спонтанной ОМБ в плазме крови пациентов с БА не отличается от такового в группе сравнения, однако в группе наблюдения отмечается существенное преобладание вторичных маркеров окислительного повреждения белка (КДНФГ). Уровни как спонтанной, так и индуцированной ОМБ пМЯЛ пациентов с БА статистически не отличается от суммарного уровня ОМБ пациентов без признаков нейродегенерации. Суммарные уровни продуктов спонтанной и индуцированной ОМБ МЯЛ пациентов с БА превышают аналогичные показатели в группе сравнения. Полученные результаты свидетельствуют о существенном истощении РАП как плазмы крови, так и пМЯЛ

и МЯЛ пациентов с БА. В динамическом аспекте наиболее существенно снижается РАП плазмы крови, в меньшей степени - РАП МЯЛ.

В плазме крови пациентов с БА не обнаружено статистически достоверных корреляций между уровнем ОМБ и активностью лизосомальных цистеиновых протеаз. В пМЯЛ и МЯЛ при БА выявлена отрицательная обратная связь средней силы между уровнем карбонильных производных модифицированных белков и активностью катепсина Н, что может свидетельствовать об активном участии протеазы в деградации продуктов окислительного стресса. В пМЯЛ пациентов с деменцией сосудистого происхождения, а также у пациентов, не имеющих признаков деменции и нейродегенерации, обнаружена отрицательная корреляция средней силы между активностью катепсинов В и L и уровнем ОМБ, что, возможно, связано с утилизацией продуктов карбонилирования белков лизосомальными протеазами. В плазме крови пациентов без признаков деменции и нейродегенерации выявлена умеренная прямая зависимость между уровнем ОМБ и активностью катепсина L, связанная, вероятно, с карбонилированием самой протеазы

Степень выраженности ЭИ плазмы крови и пМЯЛ у пациентов с БА существенно не отличается от таковых при ДСГ и у пациентов группы сравнения. Уровень веществ низкой и средней молекулярной массы МЯЛ пациентов с БА превышает аналогичный в группе сравнения, что подтверждает важность изучения метаболизма лимфоцитов как периферических маркеров нарушенного метаболизма при нейродегенерации.

Таким образом, результаты проведенного исследования подтверждают вовлеченность клеток крови в патогенетические процессы, происходящие в организме пациентов с БА. Отклонения в метаболизме более существенно выражены в МЯЛ, чем в пМЯЛ, что подтверждает высокую диагностическую ценность этой фракции лейкоцитов в рамках дальнейшего исследования БА.

## ВЫВОДЫ

1. Болезнь Альцгеймера сопровождается повышением активности цистеиновых катепсинов В, L, Н в плазме и моноядерных лейкоцитах, а также катепсинов В и Н в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови по сравнению с пациентами без признаков нейродегенерации; при деменции сосудистого генеза в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах повышена активность катепсина L и катепсина В в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах.
2. Активность катепсина L полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов крови при болезни Альцгеймера изменяется в динамике: у пациентов с длительностью заболевания 3-5 лет выше, чем у пациентов с начальной (1-3 года) и поздней (5-10 лет) стадиями.
3. Болезнь Альцгеймера протекает на фоне повышения уровня карбонилированных белков моноядерных лейкоцитов крови; резервно-адаптационный потенциал протеолитических систем плазмы, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов крови значительно снижен; в динамике заболевания в большей степени истощается резервно-адаптационный потенциал плазмы; деменция сосудистого генеза сопровождается истощением резервно-адаптационного потенциала плазмы.
4. Болезнь Альцгеймера ассоциирована с развитием эндогенной интоксикации: уровень веществ низкой и средней молекулярной массы моноядерных лейкоцитов крови пациентов с болезнью Альцгеймера превышает аналогичный в группе сравнения, при этом в большей степени он повышен на ранних стадиях заболевания.
5. Выявлена отрицательная обратная связь средней степени между уровнем карбонильных производных модифицированных белков и активностью катепсина Н в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови при болезни Альцгеймера, а также активностью катепсинов В и L в полиморфноядерных лейкоцитах у больных с деменцией сосудистого генеза, что свидетельствует об

участии соответствующих протеиназ в деградации продуктов, накопленных в результате модификации белков.

6. Активность катепсина L в плазме крови и полиморфноядерных лейкоцитах, а также катепсина В в обеих изучаемых фракциях лейкоцитов пациентов с деменцией сосудистого генеза выше, чем у пациентов без признаков деменции и нейродегенерации.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью диагностики и мониторинга течения болезни Альцгеймера, определения степени выраженности метаболических отклонений, происходящих в организме пациентов необходима оценка данных о биохимических изменениях в лейкоцитах, преимущественно моноядерных, с последующей разработкой полимодальных панелей.

2. Определение показателей активности катепсинов, уровня ОМБ, степень выраженности эндогенной интоксикации для диагностики НДЗ, необходимо осуществлять в комплексе с другими биохимическими маркерами для повышения уровня диагностической специфичности.

3. При дифференциальной диагностике когнитивных нарушений нейродегенеративного и сосудистого генеза целесообразно проведение оценки активности катепсина L в сыворотке крови.

4. Целесообразно проведение лабораторного исследования нарастания или снижения уровня ОМБ, эндогенной интоксикации лейкоцитов в динамике БА при обосновании назначения сосудистой терапии, а также для оценки эффективности проводимой антиоксидантной терапии.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Изучение влияния активаторов и ингибиторов цистеиновых катепсинов на состояние протеаз в лейкоцитах на животных моделях НДЗ с целью поиска возможных терапевтических мишеней БА.
2. Изучение состояния других катепсинов (аспартильных – D, E, сериновых – A, G) в лейкоцитах при БА и ДСГ.
3. Определение корреляционных взаимосвязей между уровнем  $A\beta$ , тау-протеина и активностью катепсинов, уровнем ОМБ, степенью выраженности ЭИ во фракционированных лейкоцитах при БА.
4. Установленные лабораторные изменения уровня цистеиновых катепсинов являются мишенью для разработки новых лекарств, лечебных мероприятий и могут иметь научно-практическое значение для развития эффективной терапии БА.
5. Проведенное исследование способствуют поиску новых возможностей для диагностики БА на ранних стадиях, т.е. до клинических проявлений.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- APP - amyloid precursor protein, белок предшественник амилоида
- CAP37 – Cationic antimicrobial protein 37, катионный антимикробный белок
- CCL-2 – C-C motive ligand 2, фактор хемотаксиса моноцитов
- CCL-11 – C-C motive ligand 11, воспалительный хемокин, эотаксин
- CDK5 – cyclin dependent kinase, циклин-зависимая киназа 5
- GSK-3 $\beta$  – glycogen synthase kinase, гликоген-синтазная киназа 3
- ICAM-1 - intercellular adhesion molecule-1, молекулы межклеточной адгезии
- LFA-1 - Lymphocyte function-associated antigen, лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген
- LRP-1 – LDL-Receptor-Proteins, рецептор липопротеинов низкой плотности
- MHC I – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости
- MMSE – Mini Mental State Examination
- NFT - neurofibrillary tangles, нейрофибриллярные клубки
- pGlu-A $\beta$  - пироглутамат-амилоид- $\beta$ -пептиды
- RAGE - receptor for advanced glycosylation products, рецептор для перемещения продуктов гликозилирования
- TCR – T cellular receptor, Т-клеточный рецептор
- VCAM-1 – vascular adhesion molecule-1, молекулы сосудистой адгезии
- A $\beta$  – амилоид бета
- АДФНГ - альдегиддинитрофенилгидразон
- АФК – активные формы кислорода
- БА – болезнь Альцгеймера
- ВНиСММ – вещества низкой и средней молекулярной массы
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНФГ - динитрофенилгидразин
- ИЛ-1 – интерлейкин 1
- ИЛ-6 – интерлейкин 6



ИЛ-8 – интерлейкин 8

КДНФГ – кетондинитрофенилгидразон

МКБ-10 – международная классификация болезней 10-го пересмотра

НД – нейродегенерация

НДЗ – нейродегенеративное заболевание

ОМБ – окислительная модификация белка

ОС – окислительный стресс

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

ДСГ – деменция сосудистого генеза

СМЖ – спинномозговая жидкость

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

ЦНС – центральная нервная система

ЦНТФ – цилиарный нейротрофический фактор

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Андреева, Т.В. Биологические основы амилоидоза при болезни Альцгеймера / Т.В. Андреева, У.Д. Лукив, Е.И. Рогаев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2017. – Т.2, №82. – С. 226 – 246.
2. Бачинская, Н.Ю. Болезнь Альцгеймера / Н.Ю. Бачинская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал неврологии им. Б.М. Маньковского. – 2013. – №1. – С. 88 – 102.
3. Безручко, Н.В. Методология и метод оценки окислительной модификации белков в комплексе с молекулами средней массы, перспективы их применения / Н.В. Безручко, Г.К. Рубцов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник ТГПУ. – 2014. – Т.8, №149. – С. 185 – 189.
4. Булгакова, С.В. Клинико-биофизические принципы лечения сосудистой деменции и болезни Альцгеймера / С.В. Булгакова, П.И. Романчук, А.Н. Волобуев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень науки и практики. – 2019. – №5. – С. 57 – 72.
5. Взаимосвязь окислительного карбонилирования белков и лизосомального протеолиза плазмы в условиях экспериментального моделирования ишемии и ишемии-реперфузии / Р.Е. Калинин, Ю.В. Абаленихина, А.С. Пшенников, [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых – Eruditio Juvenium – 2017. – №3. – С. 338 – 351.
6. Возрастная и стресс-индуцированная протеинопатия нейронов большого мозга крыс / В.Л. Загребин, О.Н. Антошкин, О.В. Фёдорова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. – Т.3, №23. – С. 7 – 10.
7. Волобуев, А.Н. Биофизика кровообращения при сосудистой деменции и болезни Альцгеймера / А.Н. Волобуев, П.И. Романчук. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень науки и практики. – 2019. – №4. – С. 76 – 102.

8. Гаврилова, С. И. Предементная стадия болезни Альцгеймера: современные подходы к диагностике и фармакотерапии / С.И. Гаврилова. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Neurology Psychiatry*. – 2017. – Т.8, №137. – С. 44 – 49.
9. Горожанская, Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях / Э.Г. Горожанская. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2010. – №6. – С. 28 – 44.
10. Гурович, И.Я. К пониманию биомаркеров психических расстройств / И.Я. Гурович, М.Г. Узбеков. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Социальная и клиническая психиатрия*. – 2015. – Т.25, №3. – С. 80 – 83.
11. Дзуликый Янус биохимии: мочева я кислота – оксидант или антиоксидант? / Б. Галунска, Д. Паскалев, Т. Янкова, П. Чанкова. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Нефрология*. – 2004. – Т.8, №4. – С. 2 – 31.
12. Дубинина, Е.Е. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях. / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Биомедицинская химия*. – 2007. – Т.53, №4. – С. 351 – 372.
13. Залесская, Т.И. Перекисное окисление белков плазмы крови у больных глаукомой. / Т.И. Залесская, И.И. Авер, К.А. Мандрик. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Журнал ГрГМУ*. – 2007. – №3 – С. 66 – 68.
14. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеаз плазмы, моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитов крови при болезни Альцгеймера / М.Г. Сорокина, М.А. Фомина, Д.С. Петров, Н.В. Короткова. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Бюллетень Сибирской медицины*. – 2020. – Т.19, №3. – С. 83 – 88.
15. Изменение спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков печени крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота различной выраженности / С.А. Теплов, Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина, И.В. Матвеева. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Наука молодых (Eruditio juvenium)*. – 2016. – №1. – С. 50 – 54.

16. Калашникова, С.А. Морфологическая характеристика эндокринных органов при хронической эндогенной интоксикации / С.А. Калашникова, Л.В. Полякова, А.И. Щеголев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т.151, №2. – С. 211 – 214.
17. Калинин, Р.Е. Изучение возможных биохимических и морфологических маркеров феномена «po-gewlow» в эксперименте / Р.Е. Калинин, А.С. Пшенников, Р.Е. Деев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал им. акад. Б.В. Петровского. – 2018. – №1. – С. 62 – 69.
18. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике / А.И. Карпищенко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 762с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
19. Катепсины как возможный способ адаптации сосудистой стенки к окислительному стрессу в условиях ишемии и реперфузии / Р.Е. Калинин, А.С. Пшенников, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский вестник Северного Кавказа – 2017. – №2. – С. 191 – 194.
20. Катепсин D - его физиологическая роль и использование в медицине / А. М. Герасимов, Н.Ю. Борзова, Н.В. Керимкулова, А.В. Павлов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – №3. – С. 3 – 5.
21. К вопросу о биологических маркерах эффективности терапии психических и неврологических заболеваний / М.Г. Узбеков, Н.М. Максимова, В.В. Бриллиантова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2018. – №2(99). – С. 5 – 14.
22. Кичерова, О. А. Болезнь Альцгеймера / О.А. Кичерова, Л.И. Рейхерт. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т.1, №118. – С. 77 – 81.
23. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение органических психических расстройств / Российское общество психиатров. – Москва, 2014. – Текст (визуальный) : непосредственный.

24. Коберская, Н.Н. Болезнь Альцгеймера: новые критерии диагностики и терапевтические аспекты в зависимости от стадии болезни / Н.Н. Коберская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский совет. – 2017. – №10. – С. 18 – 22.
25. Ковальчук, Л.В. Иммунология: практикум: учебное пособие / Л.В. Ковальчук. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 176 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
26. Коломийцев, А.К. Особенности морфологических изменений в структурах головного мозга при сосудистой деменции / А.К. Коломийцев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – Т.55, №1. – С. 125 – 127.
27. Короткова, Н.В. Лизосомальные цистеиновые катепсины L и H плазмы и лейкоцитов крови при заболеваниях вен нижних конечностей: общие тенденции изменения активности и факторов регуляции. / Н.В. Короткова, М.А. Фомина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №6. – С. 16 – 20.
28. Котов, А.С. Сосудистая деменция / А.С. Котов, Ю.В. Елисеев, Е.В. Мухина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский совет. – 2016. – №5. – С. 39 – 41.
29. Кудлаева, А.М. Влияние L-аргинина и L-карнитина на окислительную модификацию лизосомальных белков печени крыс / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина, С.А. Исаков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Удмуртского университета. – 2017. – Т.27, №3. – С. 368 – 374.
30. Кузнецов, П.Л. Синдром эндогенной интоксикации в патогенезе вирусного гепатита / П.Л. Кузнецов, В.М. Борзунов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2013. – №4. – С. 44 – 50.
31. Максимова, Н.М. Роль цитокинов в патогенезе и терапии психических расстройств / Н.М. Максимова, Т.С. Булгакова, М.Г. Узбеков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Социальная и клиническая психиатрия. – 2019. – Т.29, №3. – С. 71 – 77.

32. Мальцев, А.В. Интенсивный синтез белка в нейронах и фосфорилирование белка предшественника бета-амилоида и тау-белка являются пусковыми факторами амилоидоза нейронов и болезни Альцгеймера / А.В. Мальцев, Н.В. Довидченко, В.К. Утешев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2013. – Т.2, №59. – С. 144 – 170.
33. Микельсон, А. Химия нуклеозидов и нуклеотидов / А. Микельсон. – М.: Мир, 1966. – 134с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
34. Модуляция функциональной активности форменных элементов крови при эндотоксикозе / Т.И. Григорьева, С.В. Аксенова, А.Г. Захаркин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник интенсивной терапии. – 2007. – №5. – С. 160 – 163.
35. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей: пер. с англ. / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: Бином-Пресс, 2013. – 239 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
36. Нейровоспаление и инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера / Я.В. Горина, А.Б. Салмина, Н.В. Кувачева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – №4. – С. 11 – 19.
37. Никитина, Ю.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе / Ю.В. Никитина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Нижегородского университета имени Н.И. Лобачевского. – 2009. – Т.6, №1. – С. 124 – 131.
38. Никольская, В.А. Биохимический аспект рассмотрения роли молекул средней массы в организме / В.А. Никольская, Ю.Д. Данильченко, З.Н. Меметова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т.26, №65. – С. 139 – 145.
39. Новиков, Д.К. Клеточные методы иммунодиагностики / Д.К. Новиков, Д.И. Новикова. – М.: Минск, 1979. – 222с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

40. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2010. – №1. – С. 74 – 78.
41. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е.Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т.41, №1. – С. 24 – 26.
42. Окислительный стресс и его влияние на функциональную активность клеток при болезни Альцгеймера / Е.Е. Дубинина, Л.В. Щедрина, Н.Г. Незнанов [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2015. – Т.61, №1. – С. 57 – 69.
43. Оценка выраженности эндогенной интоксикации при болезни Альцгеймера / М.Г. Енгальчева, М.А. Фомина, Д.С. Петров [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бутлеровские сообщения. – 2020. – Т.63, №7. – С. 119 – 125.
44. Оценка окислительной модификации белков плазмы крови и лейкоцитов при болезни Альцгеймера / М.Г. Енгальчева, М.А. Фомина, Д.С. Петров, Т.В. Тазина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Молекулярная медицина. – 2020. – Т. 18, №5. – С. 41 – 45.
45. Подунай, Ю.А. Возрастная динамика активности катепсинов и содержания среднемолекулярных пептидов в мышцах морского ерша / Ю.А. Подунай, И.Н. Залевская, И.И. Руднева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т.22, №4. – С. 128 – 134.
46. Показатели окислительного стресса и эндогенной интоксикации в периферической крови у больных с экзогенно-органическими расстройствами в динамике фармакотерапии / Н.М. Кротенко, А.С. Бойко, Е.М. Епанчинцева, С.А. Иванова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень Сибирской медицины. – 2012. – №1. – С. 179 – 185.

47. Пупышев, А.Б. Лизосомальные болезни накопления в Европе: проблема нейродегенерации и новые возможности терапевтических воздействий / А.Б. Пупышев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Сибирский научный медицинский журнал. – 2016. – №2. – С. 35 – 43.
48. Пупышев, А.Б. Пермеабиллизация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор / А.Б. Пупышев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Цитология. – 2011. – Т.53, №4. – С. 313 – 324.
49. Рендаков, Н.Л. Роль лизосомальных протеиназ и эстрадиола в нейродегенерации, индуцированной болезнью Альцгеймера / Н.Л. Рендаков, Л.А. Лысенко, Ю.В. Люпина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Доклады академии наук. – 2015. – №1. – С. 112 – 115.
50. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза / Г.А. Яровая, Е.А. Нешкова, Е.А. Мартынова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Лабораторная медицина. – 2011. – №11. – С. 39 – 52.
51. Серологические маркеры эндогенной интоксикации в комплексной оценке реабилитационного потенциала больных, перенесших ишемический инсульт / В.В. Алферова, М.Г. Узбеков, Э.Ю. Мисионжник [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Социальная и клиническая психология. – 2011. – Т.3, №21. – С. 54 – 57.
52. Соколик, В.В. Болезнь Альцгеймера: генетическая предрасположенность, биохимические механизмы и психические проявления / В.В. Соколик. – Текст (визуальный) : непосредственный // Украинский вестник психоневрологии. – 2007. – Т.3, №52. – С. 101 – 105.
53. Сорокина, М.Г. Современные представления о роли лизосомальных протеиназ в патогенезе болезни Альцгеймера / М.Г. Сорокина, М.А. Фомина, Д.С. Петров – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. – Т.6, №4. – С. 582 – 588.
54. Стефанова, Н.А. Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера / Н.А. Стефанова, Н.Г. Колосова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Московского университета. Биология. – 2016. – №1. – С. 6 – 13.



55. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т.8, №3. – С. 20 – 27.
56. Узбеков, М.Г. Потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода / М.Г. Узбеков, И.Я. Гурович, С.А. Иванова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Социальная и клиническая психиатрия. – 2016. – №26. – С. 77 – 93.
57. Узбеков, М.Г. Эндогенная интоксикация и ее роль в патогенетических механизмах психических расстройств / М.Г. Узбеков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Социальная и клиническая психиатрия. – 2019. – Т.29, №4. – С. 14 – 20.
58. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Альцгеймера / Министерство здравоохранения и социального развития РФ, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр психического здоровья» Российской академии медицинских наук. – Москва, 2013. – Текст (визуальный) : непосредственный.
59. Фомина, М.А. Влияние L-карнитина *in vitro* на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и состояние лизосомальных мембран / М.А. Фомина, М.А. Кудлаева, А.Н. Рябков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2017. – Т.1, №25. – С. 14 – 20.
60. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – М.: Рязань, 2014. – 61с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
61. Фомина, Н.В. Оценка связи активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы крови и показателей эндотелиальной дисфункции у пациентов с заболеваниями вен нижних конечностей / Н.В. Фомина, М.А. Фомина. – Текст

- (визуальный) : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014. – №1. – С. 60 – 67.
62. Фурман, Ю.В. Некоторые функции протеолитических ферментов в норме и при патологии / Ю.В. Фурман, М.Ю. Смахтин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биологические науки. – 2017. – Т.4, №13. – С. 3 – 4.
63. Цыганкова, О.В. Лизосомальные ферменты. Новый взгляд на фундаментальные материи с позиций кардиолога / О.В. Цыганкова, Л.А. Руюткина, З.Г. Бондарева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Цитокины и воспаление. – 2009. – №4. – С. 11 – 17.
64. Чердак, М.А. Сосудистая деменция / М.А. Чердак, О.В. Успенская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2010. – №1. – С. 82 – 86.
65. Черний, В.И. Нарушения иммунитета при критических состояниях: особенности диагностики / В.И. Черний, А.Н. Нестеренко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Внутренняя медицина. – 2007. – №3. – С. 25 – 39.
66. Щерина, А.В. Свободнорадикальная активность в патогенезе опухолей головного мозга / А.В. Щерина, К.Э. Крощикина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука Молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. – №1. – С. 6 – 12.
67. Эндогенная интоксикация и реакции компенсации в восстановительном периоде ишемического инсульта / В.В. Алферова, М.Г. Узбеков, Э.Ю. Мисионжик [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2010. – Т.110, №4 (Спец. выпуск). – С. 36 – 41.
68. Achilli, C. Brain, immune system and selenium: a starting point for a new diagnostic marker for Alzheimer's disease? / C. Achilli, A. Ciana, G. Minetti. – Text : visual // *Perspect Public Health*. – 2018. – V. 138, №4. – P. 223 – 226.
69. A Comparison of Lysosomal Enzymes Expression Levels in Peripheral Blood of Mild- and Severe-Alzheimer's Disease and MCI Patients: Implications for Regenerative Medicine Approaches / F. Morena, C. Argentati, R. Trotta [et al.]. – Text : visual // *Int J Mol Sci*. – 2017. – V.18, №8. – P. 1806 – 1812.

70. Agostinho, P. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease / P. Agostinho, R.A. Cunha, C. Oliveira. – Text : visual // *Current Pharmaceutical Design*. – 2010. – V.16, №25. – P. 2766 – 2778.
71. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease / E. J. Goetzl, A. Boxer, J.B. Schwartz [et al.]. – Text : visual // *Neurology*. – 2015. – V.85, №1. – P. 40 – 47.
72. Altered Redox State in Whole Blood Cells from Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease / I. Martínez de Toda, L. Miguélez, C. Vida [et al.]. – Text : visual // *J Alzheimer's Dis*. – 2019. – V.71, №1. – P. 153 – 163.
73. Alzheimer's Disease and Its Potential Alternative Therapeutics / B. Kisby, J.T. Jarrell, M.E. Agar [et al.]. – Text : visual // *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. – 2019. – V.9, №5. – P. 477 – 481.
74. Alzheimer's disease: as it was in the beginning / S. Kozlov, A. Afonin, I. Evsyukov, A. Bondarenko. – Text : visual // *Reviews in the Neuroscience*. – 2017. – V.28, №8. – P. 825 – 843.
75. Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis / D. Eratne, S.M. Loi, S. Farrand [et al.]. – Text : visual // *Australas Psychiatry*. – 2018. – V.26, №4. – P. 347 – 357.
76. Amyloid-beta precursor protein expression and modulation in human embryonic stem cells: a novel role for human chorionic gonadotropin / P. Porayette, M.J. Gallego, M.M. Kaltcheva [et al.]. – Text : visual // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2007. – V.364, №3. – P. 522 – 527.
77. An Aspartyl Cathepsin Targeted PET Agent: Application in an Alzheimer's Disease Mouse Model / J.A. Snir, M. Suchy, G.A. Bindseil [et al.]. – Text : visual // *Journal Alzheimers Disease*. – 2018. – V.61, №3. – P. 1241 – 1252.
78. A peptide zipcode sufficient for anterograde transport within amyloid precursor protein / P. Satpute-Krishnan, J.A. DeGiorgis, M.P. Conley [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – V.103, №44. – P. 16532 – 16537.

79. Autophagy activation aggravates neuronal injury in the hippocampus of vascular dementia rats / B. Liu, J. Tang, J. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Neural Regen Res.* – 2014. – V.9, №13. – P. 1288 – 1296.
80. Barrett, A.J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L / A.J. Barrett, H. Kirschke. – Text : visual // *Methods in Enzymol.* – 1981. – №80. – P. 535 – 561.
81. Bennett, S. Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology / S. Bennett, M.M. Grant, S. Aldred. – Text : visual // *J Alzheimer's Dis.* – 2009. – V.17, №2. – P. 245 – 257.
82. Biomarkers of dementia in obstructive sleep apnea / A.A. Baril, J. Carrier, A. Lafrenière [et al.]. – Text : visual // *Sleep Med Rev.* – 2018. – №42. – P. 139 – 148.
83. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment / F. Mangialasche, M.C. Polidori, R. Monastero [et al.]. – Text : visual // *Ageing Res Rev.* – 2009. – V.8, №4. – P. 285 – 305.
84. Bisht, K. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress / K. Bisht, K. Sharma, M.E. Tremblay. – Text : visual // *Neurobiol Stress.* – 2018. – №9. – P. 9 – 21.
85. Blennow, K. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future / K. Blennow, H. Zetterberg. – Text : visual // *Journal International Medicine.* – 2018. – V.284, №6. – P. 643 – 663.
86. Blennow, K. Fluid biomarker-based molecular phenotyping of Alzheimer's disease patients in research and clinical settings / K. Blennow, H. Zetterberg. – Text : visual // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* – 2019. – №168. – P. 3 – 23.
87. Blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, and cognitive decline in older adults / G.L. Bowman, L. Dayon, R. Kirkland [et al.]. – Text : visual // *Published correction appears in Alzheimer's Dement.* – 2019. – V.15, №2. – P. 319 – 325.
88. Blood-brain barrier damage in vascular dementia / M. Ueno, Y. Chiba, K. Matsumoto [et al.]. – Text : visual // *Neuropathology.* – 2016. – V.36, №2. – P. 115 – 124.

89. Blood-Derived Plasma Protein Biomarkers for Alzheimer's Disease in Han Chinese / Z. Cheng, J. Yin, H. Yuan [et al.]. – Text : visual // *Front Aging Neurosci.* – 2018. – V.10. – P. 414 – 418.
90. Bondi, M.W. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future / M.W. Bondi, E.C. Edmonds, D.P. Salmon. – Text : visual // *Journal of the International Neuropsychological Society.* – 2017. – V.23, №9-10. – P. 818 – 831.
91. Brunk, U.T. Lysosomal involvement in apoptosis / U.T. Brunk, J. Neuzil, J.W. Eaton. – Text : visual // *Redox Rep.* – 2001. – V.6, №2. – P. 91 – 97.
92. Butterfield, D.A. Oxidative Stress, Amyloid- $\beta$  Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease / D.A. Butterfield, D. Boyd-Kimball. – Text : visual // *Journal Alzheimer's disease.* – 2018. – V.62, №3. – P. 1345 – 1367.
93. Butterfield, D.A. Perspectives on Oxidative Stress in Alzheimer's Disease and Predictions of Future Research Emphases / D.A. Butterfield. – Text : visual // *Journal Alzheimer's disease.* – 2018. – V.64, №1. – P. 469 – 479.
94. Cai, Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.J. Yan. – Text : visual // *Journal of Biochemical and Pharmacological Research.* – 2013. – V.1, №1. – P. 15 – 26.
95. Carbonyl proteins as a clinical marker in Alzheimer's disease and its relation to tryptophan degradation and immune activation / J. Greilberger, D. Fuchs, F. Leblhuber [et al.]. – Text : visual // *Clinical laboratory.* – 2010. – V.56, №9-10. – P. 441 – 448.
96. Carija, A. Evaluation of the Impact of Protein Aggregation on Cellular Oxidative Stress in Yeast / A. Carija, S. Ventura, S. Navarro. – Text : visual // *J Vis Exp.* – 2018. – V.136. – P. 574 – 578.
97. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia—warm reperfusion injury / E.S. Baskin-Bey, A. Canbay, S.F. Bronk [et al.]. – Text : visual // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2005. – Vol. 288, №2. – P. 396 – 402.

98. Cathepsin B in neurodegeneration of Alzheimer's disease, traumatic brain injury, and related brain disorders / V. Hook, M. Yoon, C. Mosier [et al.]. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* – 2020. – V.1868, №8. – P. 420 – 428.
99. Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome / H. Bai, B. Yang, W. Yu [et al.]. – Text : visual // *Experimental Cell Research.* – 2018. – V.362, №1. – P. 180 – 187.
100. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells / L.E. Bröker, C. Huisman, S.W. Span [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res.* – 2004. – V.64, №1. – P. 27 – 30.
101. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice / Z. Wu, J. Ni, Y. Liu [et al.]. – Text : visual // *Brain, Behavior and Immunity.* – 2017. – V.65. – P. 350 – 361.
102. Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter / S. Yasothornsrikul, D. Greenbaum, K.F. Medzihradzsky [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – V.100, №16. – P. 9590 – 9595.
103. Cenini, G. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View/ G. Cenini, A. Lloret, R. Cascella. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2019. – V.9. – P. 201 – 209.
104. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: An update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry / P. Lewczuk, P. Riederer, S.E.O'Bryant [et al.]. – Text : visual // *World Journal Biological Psychiatry.* – 2018. – V.19, №4. – P. 244 – 328.
105. Cerebrospinal fluid cathepsin B and S / E. Nilsson, C. Bodolea, T. Gordh, A. Larsson. – Text : visual // *Neurol Sci.* – 2013. – V.34, №4. – P. 445 – 448.
106. Cermak, S. Loss of cathepsin B and L leads to lysosomal dysfunction, NPC-like cholesterol sequestration and accumulation of the key Alzheimer's proteins /S. Cermak,

- M. Kosicek, A. Mladenovic-Djordjevic. – Text : visual // PLOS ONE. – 2016. – V.30. – P. 1 – 17.
107. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / M. Padurariu, A. Ciobica, L. Hritcu [et al.]. – Text : visual // Neurosci Lett. – 2010. – V.469, №1. – P. 6 – 10.
108. Chen, Z. Oxidative stress in Alzheimer's disease / Z. Chen, C. Zhong. – Text : visual // Neuroscience Bulletin. – 2014. – V.30. – P. 271 – 278.
109. Chipollini, V. Emerging Biomarkers in Vascular Cognitive Impairment and Dementia: From Pathophysiological Pathways to Clinical Application / V. Chipollini, F. Troili, F. Giubilei. – Text : visual // Int J Mol Sci. – 2019. – V.20, №11. – P. 2812 – 2820.
110. Chong, M.S. Biomarkers in preclinical Alzheimer's disease / M.S. Chong, W.S. Lim, S. Sahadevan. – Text : visual // Curr Opin Investig Drugs. – 2006. – V.7, №7. – P. 600 – 607.
111. Circulating plasma levels of cathepsin S and L are not associated with disease severity in patients with rheumatoid arthritis / T. Ruge, A. Södergren, S. Wållberg-Jonsson [et al.]. – Text : visual // Scand J Rheumatol. – 2014. – V.43, №5. – P. 371 – 373.
112. Čolak, E. New markers of oxidative damage to macromolecules / E. Čolak. – Text : visual // JMB. – 2008. – P. 1 – 16.
113. Comparison of Extracellular and Intracellular Blood Compartments Highlights Redox Alterations in Alzheimer's and Mild Cognitive Impairment Patients / N. Arce-Varas, G. Abate, C. Prandelli [et al.]. – Text : visual // Current Alzheimer Research. – 2017. – V.14, №1. – P. 112 – 122.
114. Congdon, E. E. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. Nature reviews / E.E. Congdon, E.M. Sigurdsson. – Text : visual // Neurology. – 2018. – V.14, №7. – P. 399 – 415.
115. Constanze, R. The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function/ R. Constanze, H. Sébastien, B. De Strooper. – Text : visual // The EMBO journal. – 2005. – №24. – P. 3996 – 4006.

116. Could Alzheimer's Disease Originate in the Periphery and If So How So? /G. Morris, M. Berk, M. Maes, B.K. Puri. – Text : visual // *Molecular Neurobiology*. – 2019. – V.56, №1. – P. 406 – 434.
117. Crystal structures of human procathepsin H / Y. Hao, W. Purtha, C. Cortesio [et al.]. – Text : visual // *PLoS One*. – 2018. – V.25, №13(7). – P. 235 – 239.
118. Current state of Alzheimer's fluid biomarkers / J. L. Molinuevo, S. Ayton, R. Batrla [et al.]. – Text : visual // *Acta Neuropathologica*. – 2018. – V.136, №6. – P. 821 – 853.
119. Cysteine Cathepsins in the Secretory Vesicle Produce Active Peptides: Cathepsin L Generates Peptide Neurotransmitters and Cathepsin B Produces Beta-Amyloid of Alzheimer's Disease / V. Hook, L. Funkelstein, J. Wegrzyn[et al.]. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2012. – V.1824, №1. – P. 89 – 104.
120. Decreased expression of cathepsin D in monocytes is related to the defective degradation of amyloid  $\beta$  in Alzheimer's disease / Z. Y. Tian, T. Wang, D.S. Shang [et al.]. – Text : visual // *J. Alzheimer's Dis.* – 2014. – V.42, №2. – P. 511 – 520.
121. De Strooper, B. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein /B. De Strooper, W. Annaert. – Text : visual // *J Cell Sci*. – 2000. – V.113, №11. – P. 1857 – 1870.
122. Dhanavade, M.J. Molecular modeling approach to explore the role of cathepsin B from *Hordeum vulgare* in the degradation of A $\beta$  peptides / M.J. Dhanavade, R.S. Parulekar, S. A. Kamble. – Text : visual // *Molecular bioSystems*. – 2016. – V.1, №12. – P. 162 – 178.
123. Didonna, A. The role of neurofilament aggregation in neurodegeneration: lessons from rare inherited neurological disorders / A. Didonna, P. Opal. – Text : visual // *Molecular Neurodegeneration*. – 2019. – V.14. – P. 19 – 25.
124. Differences in peripheral oxidative stress markers in Alzheimer's disease, vascular dementia and mixed dementia patients / H. Hatanaka, H. Hanyu, R. Fukasawa [et al.]. – Text : visual // *Geriatr Gerontol Int*. – 2015. – №1. – P. 53 – 58.



125. Dubinina, E.E. The factors of oxidative stress in neurodegenerative diseases (vascular dementia, Alzheimer disease) / E.E. Dubinina, S.V. Kovrugina, P.V. Konovalov. – Text : visual // *Adv Gerontol.* – 2007. – V.20, №4. – P. 109 – 113.
126. Dysfunction of Cerebrovascular Endothelial Cells: Prelude to Vascular Dementia. *Front* / F. Wang, Y. Cao, L. Ma [et al.]. – Text : visual // *Aging Neurosci.* – 2018. – V.10. – P. 113 – 119.
127. Embury, C.M. Cathepsin B improves  $\beta$ -Amyloidosis and learning and memory in models of Alzheimer's Disease / C.M. Embury, B. Dyavarshetty, Y. Lu. – Text : visual // *Journal of Neuroimmune Pharmacology.* – 2017. – V.2, №12. – P. 340 – 352.
128. Endo-lysosomal and autophagic dysfunction: a driving factor in Alzheimer's disease? / L.S. Whyte, A.A. Lau, K.M. Hemsley [et al.]. – Text : visual // *Journal of Neurochemistry.* – 2017. – V.140, №5. – P. 703 – 717.
129. Endothelial activation in lacunar stroke subtypes / I. L. Knottnerus, J. W. Govers-Riemslog, K. Hamulyak [et al.]. – Text : visual // *Stroke.* – 2010. – V.41, №8. – P. 1617 – 1622.
130. Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols / J. Zeng, R.A. Dunlop, K.J. Rodgers, M.J. Davies. – Text : visual // *Biochem J.* – 2006. – V.1, №398(2). – P. 197 – 206.
131. Factors associated with the onset of Alzheimer's disease: Data mining in the French nationwide discharge summary database between 2008 and 2014 / M. Rochoy, R. Bordet, S. Gautier, E. Chazard. – Text : visual // *PLoS One.* – 2019. – V.25, №14. – P. 7 – 16.
132. Farrall, A.J. Blood–brain barrier: Ageing and microvascular disease—systematic review and meta-analysis / A. J. Farrall, J. M. Wardlaw. – Text : visual // *Neurobiol. Aging.* – 2009. – №30. – P. 337 – 352.
133. Folstein, M.F. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. M.F. Folstein, S.E Folstein, P.R.McHugh. – Text : visual // *J Psychiatr Res.* – 1975. – V.12, №3. – P. 189 – 198.
134. Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's disease / I.

- Maté, J. Cruces, L. Giménez-Llort, M. De la Fuente. – Text : visual // J Alzheimers Dis. – 2015.– V.43, №1. – P. 213 – 226.
135. Garre-Olmo, J. Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias / J. Garre-Olmo. – Text : visual // Rev Neurol. – 2018. – V.66, №11. – P. 377 – 386.
136. Gibson, G.E. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease / G.E. Gibson, H.M. Huang. – Text : visual // Front Biosci. – 2002. – №7. – P.1007 – 1015.
137. Gold, M.  $\beta$ -amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease / M. Gold, J. El Khoury. – Text : visual // Seminars in Immunopathology. – 2015. – V.6, №37. – P. 607 – 611.
138. Gray, S.C. Shifting equilibriums in Alzheimer's disease: the complex roles of microglia in neuroinflammation, neuronal survival and neurogenesis / S. C. Gray, K. J. Kinghorn, N.S. Woodling. – Text : visual // Neural Regeneration Research. – 2020. – V.15, №7. – P. 1208 – 1219.
139. Grimm, A. Mitochondrial dysfunction: the missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease / A. Grimm, K. Friedland, A. Eckert. – Text : visual // Biogerontology. – 2016. – №17. – P. 281 – 296.
140. Gustaw-Rothenberg, K. Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia / K. Gustaw-Rothenberg, K. Kowalczyk, M. Stryjecka-Zimmer. – Text : visual // Geriatr Gerontol Int. – 2010. –V.10, №2. – P. 161 – 166.
141. Higher cathepsin B levels in plasma in Alzheimer's disease compared to healthy controls / J. Sundelöf, J. Sundström, O. Hansson [et al.]. – Text : visual // J Alzheimer's Dis. – 2010. – V.22, №4. – P. 1223 – 1230.
142. Hishita, T. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome - cell line P39 / T. Hishita. – Text : visual // Cancer Res. – 2001. – V.61. – P. 2878 – 2884.
143. Hodson, R. Alzheimer's disease / R. Hodson. – Text : visual // Nature. – 2018. – №559. – P. 771 – 775.

144. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade / C. R. Jack Jr, D.S. Knopman, W.J. Jagust [et al.]. – Text : visual // *Lancet Neurology*. – 2010. – №9. – P. 119 – 128.
145. Iadecola, C. The pathobiology of vascular dementia / C. Iadecola. – Text : visual // *Neuron*. – 2013. – V.80, №4. – P. 844 – 866.
146. Immunosenescence, inflammation and Alzheimer's disease / A. Martorana, M. Bulati, S. Buffa [et al.]. – Text: visual // *Longevity & Healthspan*. – 2012. – V.1. – A.8.
147. Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress / C. Vida, I. Martinez de Toda, A. Garrido [et al.]. – Text : visual // *Front Immunol*. – 2018. – V.11, №8. – P. 1974 – 1978.
148. Increased elastase and cathepsin G activity in activated lymphocytes from aged patients: role of denutrition and dementia / G. Péterszegi, S. Texier, A. M. Robert [et al.]. – Text : visual // *Arch Gerontol Geriatr*. – 1997. – V.25, №3. – P. 285 – 298.
149. Increased Susceptibility to Oxidative Death of Lymphocytes from Alzheimer Patients Correlates with Dementia Severity / D. P. Ponce, F. Salech, C. D. SanMartin [et al.]. – Text : visual // *Current Alzheimer Research*. – 2014. – V.11, № 9. – P. 892 – 898.
150. Inflammation in neurodegenerative diseases / S. Amor, L.A.N. Peferoen, D.Y.S. Vogel [et al.]. – Text : visual // *An update Immunology*. – 2014. – V.142. – P. 151 – 166.
151. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients / D. Blum-Degen, T. Müller, W. Kuhn [et al.]. – Text : visual // *Neurosci. Lett*. – 1995. – V.202. – P. 17 – 20.
152. Involvement of inflammation in Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic potential of anti-inflammatory agents / S. Shadfar, C.J. Hwang, M.S. Lim [et al.]. – Text : visual // *Arch Pharm Res*. – 2015. – V.38, №12. – P. 2106 – 2119.
153. Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease / J.A. Duce, A. Tsatsanis, M.A. Cater [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 2010. – V.142, №6. – P. 857 – 867.

154. Is sticky blood bad for the brain: Hemostatic and inflammatory systems and dementia in the Caerphilly Prospective Study / J. Gallacher, A. Bayer, G. Lowe [et al.]. – Text : visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2010. – V.30, №3. – P. 599 – 604.
155. Ivanov, P.A. Neutrophil's functional state in Alzheimer's disease / P.A., Ivanov A.A. Shmakova, N.M. Mikhailova. – Text : visual // VII International symposium «Interaction of the nervous and immune systems in health and disease». – St. Petersburg, 2019. – P. 6 – 8.
156. Jiang, T. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease / T. Jiang, Q. Sun, S. Chen. – Text : visual // *Progress in Neurobiology.* – 2016. – №147. – P. 1 – 19.
157. Jouanne, M. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents / M. Jouanne, S. Rault, A. S. Voisin-Chiret. – Text : visual // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2017. – №139. – P. 153 – 167.
158. Kirschke, H. Cathepsin H / H. Kirschke. – Text : visual // *Handbook of Proteolytic Enzymes.* – 2013. – №2. – P. 1795 – 1800.
159. Knowles, T.P. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases / T. P. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson. – Text : visual // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014. – V.15, №6. – P. 384 – 396.
160. Kontush, K. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease / K. Kontush, S. Schekatolina. – Text : visual // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – №1031. – P. 249 – 262.
161. Kumar, A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update / A. Kumar, A. Singh, P. Ekavali. – Text : visual // *Pharmacological Report.* – 2015. – V.67, №2. – P. 195 – 203.
162. Lane, C.A. Alzheimer's disease / C.A. Lane, J. Hardy, J.M. Schott. – Text : visual // *European Journal of Neurology.* – 2018. – V.25, №1. – P. 59 – 70.
163. Laurent, C. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? / C. Laurent, L. Buée, D. Blum. – Text : visual // *Biomed J.* – 2018. – V.41, №1. – P. 21 – 33.

164. Lovell, M.A. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease / M.A. Lovell, W.R. Markesbery. – Text : visual // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V.35, №22. – P. 7497 – 7504.
165. Lowry, J.R. Emerging roles of microglial cathepsins in neurodegenerative disease / J. R. Lowry, A. Klegeris. – Text : visual // *Brain Research Bulletin.* – 2018. – №139. – P. 144 – 156.
166. Lull, M.E. Microglial activation and chronic neurodegeneration / M.E. Lull, M.L. Block. – Text : visual // *Neurotherapeutics.* – 2010. – №7. – P. 354 – 365.
167. Lymphocytes in Alzheimer's disease pathology: Altered signaling pathways / N. Esteras, C. Alquézar, A. de la Encarnación, A. Martín-Requero. – Text : visual // *Current Alzheimer Research.* – 2016. – V.13, №4. – P. 439 – 449.
168. Lysosomal Dysregulation in the Murine AppNL-G-F/NL-G-F Model of Alzheimer's Disease / L.S. Whyte, S. Hassiotis, K. J. Hattersley [et al.]. – Text : visual // *Neuroscience.* – 2020. – V.429. – P. 143 – 155.
169. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / J. Greilberger, C. Koidl, M. Greilberger [et al.]. – Text : visual // *Free Radic Res.* – 2008. – V.42, №7. – P. 633 – 638.
170. Mantzavinos, V. Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis / V. Mantzavinos, A. Alexiou. – Text : visual // *Current Alzheimer Research.* – 2017. – V.14, №11. – P. 1149 – 1154.
171. Markers of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease pathology in older adults / J. Popp, A. Oikonomidi, D. Tautvydaitė [et al.]. – Text : visual // *Brain. Behavior and Immunology.* – 2017. – №62. – P. 203 – 211.
172. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies / P. K. Kamat, A. Kalani, S. Rai [et al.]. – Text : visual // *Mol Neurobiol.* – 2016. – V.53, №1. – P. 648 – 661.
173. Merlini, M. Tau pathology-dependent remodelling of cerebral arteries precedes Alzheimer's disease-related microvascular cerebral amyloid angiopathy / M. Merlini, D.

- Wanner, R.M. Nitsch. – Text : visual // *Acta Neuropathol.* – 2016. – V.131, №5. – P. 737 – 752.
174. Mietelska-Porowska, A. T Lymphocytes and Inflammatory Mediators in the Interplay between Brain and Blood in Alzheimer's Disease: Potential Pools of New Biomarkers / A. Mietelska-Porowska, U. Woida. – Text : visual // *Journal of Immunology Research.* – 2017. – V.2017. – P. 4626540.
175. Mikami, T. Does the relationship exist between the urate pool in the body and lipid peroxidation during exercise? /T. Mikami, Y. Yoshino, A. Ito. – Text : visual // *Free Rad Res.* – 2000. – V.32, №1. – P. 31 – 39.
176. Mimicry of Central-Peripheral Immunity in Alzheimer's Disease and Discovery of Neurodegenerative Roles in Neutrophil /J. Park, S.H. Baik, I. Mook-Jung [et al.]. – Text : visual // *Frontiers Immunology.* – 2019. – V.10. – P. 22 – 31.
177. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects / T. Lashley, J.M. Schott, P. Weston [et al.]. – Text : visual // *Dis Model Mech.* – 2018. – V.8, №11. – P. 1 – 9.
178. Mueller-Steiner, S. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease / S. Mueller-Steiner, Y. Zhou, H. Arai. – Text : visual // *Neuron.* – 2006. – V.51. – P. 703 – 714.
179. Neural coding: A single neuron's perspective / A. Azarfar, N. Calcini, C. Huang [et al.]. – Text : visual // *Neuroscience Biobehavior Review.* – 2018. – №94. – P. 238 – 247.
180. Neuroinflammation in Alzheimer's disease / M.T. Heneka, M.J. Carson, J. El Khoury [et al.]. – Text : visual // *Lancet Neurol.* – 2015. – №14. – P. 388 – 405.
181. Neuropeptides in Alzheimer's Disease: An Update / C. Petrella, M.G. Di Certo, C. Barbato [et al.]. – Text : visual // *Curr Alzheimer Res.* – 2019. – V.16, №6. – P. 544 – 558.
182. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin / E. Zenaro, E. Pietronigro, V. Della Bianca [et al.]. – Text : visual // *Nat Med.* – 2015. – V.21, №8. – P. 880 – 886.

183. Nixon, R.A. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease / R.A. Nixon. – Text : visual // *FASEB J.* – 2017. – V.31, №7. – P. 2729 – 2743.
184. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L / U. Felbor, B. Kessler, W. Mothes [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2002. – V.99, №12. – P. 7883 – 7888.
185. Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain / S. Takeda, S. Wegmann, H. Cho [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications.* – 2015. – №6. – P. 8490.
186. Neuropeptides in Alzheimer's disease: from pathophysiological mechanisms to therapeutic opportunities / D. Van Dam, A. Van Dijck, L. Janssen, P.P. De Deyn. – Text : visual // *Curr Alzheimer Res.* – 2013. – V.10, №5. – P. 449 – 468.
187. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and its Receptors in Alzheimer's Disease (AD) Brain Regions: Differential Findings in AD with and without Depression / D.W. Dekens, P.J. Naudé, S. Engelborghs [et al.]. – Text : visual // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – V.55, №2. – P. 763 – 776.
188. Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression / Y. Dong, J. Lagarde, L. Xicota [et al.]. – Text : visual // *Annals of Neurology.* – 2018. – V.83, №2. – P. 387 – 405.
189. Novel Peptidomic Approach for Identification of Low and High Molecular Weight Tauopathy Peptides Following Calpain Digestion, and Primary Culture Neurotoxic Challenges / H. Yadikar, C. Johnson, N. Pafundi [et al.]. – Text : visual // *International Journal Molecular Science.* – 2019. – V.20, №20. – P. 5213.
190. Nuclear cathepsin L activity is required for cell cycle progression of colorectal carcinoma cells / T. Tamhane, R. Llukumbura, S. Lu [et al.]. – Text : visual // *Biochimie.* – 2016. – V.122. – P. 208 – 218.
191. Nucleic acid oxidation: an early feature of Alzheimer's disease / M. A. Bradley-Whitman, M. D. Timmons, T. L. Beckett [et al.]. – Text : visual // *Journal Neurochem.* – 2014. – V.128, №2. – P. 294 – 304.

192. Oxidative balance, homocysteine, and uric acid levels in older patients with Late Onset Alzheimer's Disease or Vascular Dementia / C. Cervellati, A. Romani, D. Seripa [et al.]. – Text : visual // *J Neurol Sci.* – 2014. – V.15, №337. – P. 156 – 161.
193. Oxidative modification of blood plasma proteins in elderly people with vascular dementia / E.E. Dubinina, P.V. Konovalov, I.B. Soliternova [et al.]. – Text : visual // *Ukr Biokhim Zh.* – 2001. – V.73, №1. – P. 125 – 32.
194. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases / A. Singh, R. Kukreti, L. Saso, S. Kukreti. – Text : visual // *Molecules.* – 2019. – V.24, №8. – P. 1583 – 1592.
195. Oxidative Stress and Aberrant Cell Cycle in Alzheimer's Disease Lymphocytes: Diagnostic Prospects / J. Wojsiat, C. Prandelli, K. Laskowska-Kaszub [et al.]. – Text : visual // *J Alzheimers Dis.* – 2015. – V.46, №2. – P. 329 – 350.
196. Oxidative stress and altered mitochondrial protein expression in the absence of amyloid- $\beta$  and tau pathology in iPSC-derived neurons from sporadic Alzheimer's disease patients / J.H. Birnbaum, D. Wanner, A.F. Gietl [et al.]. – Text : visual // *Stem Cell Res.* – 2018. – V.27. – P. 121 – 130.
197. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease / C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot [et al.]. – Text : visual // *Redox Biology.* – 2018. – V.14. – P. 450 – 464.
198. Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative diseases / J. Vitte, B.F. Michel, P. Bongrand, J.L. Gastaut. – Text : visual // *J Clin Immunol.* – 2004. – V.24, №6. – P. 683 – 692.
199. Oxidative Stress, Protein Modification and Alzheimer Disease / A. Tramutola, C. Lanzillotta, M. Perluigi, D. Butterfield. – Text : visual // *Brain research bulletin.* – 2016. – V.133. – P. 205 – 221.
200. Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies / K. Facecchia, L.A. Fochesato, S.D. Ray [et al.]. – Text : visual // *J Toxicol.* – 2011. – V.2011. – P.683728.



201. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / L.L. Torres, N.B. Quaglio, G. T. de Souza [et al.]. – Text : visual // *J Alzheimers Dis.* – 2011. – V.26, №1. – P. 59 – 68.
202. Persson, T. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: why did antioxidant therapy fail? / T. Persson, O. Popescu, A. Cedazo-Minguez. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2014. – V.2014. – P. 427318.
203. Phagocytic activity and state of bactericidal systems in polymorphonuclear leukocytes from patients with Alzheimer's disease / T.V. Davydova, V.G. Fomina, N.I. Voskresenskaya, O.A. Doronina. – Text : visual // *Bull Exp Biol Med.* – 2003. – V.136, №4. – P. 355 – 357.
204. Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease / S. Mondragón-Rodríguez, G. Perry, X. Zhu [et al.]. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2013. – V.2013. – P. 940603.
205. Pišlar, A. Cysteine cathepsins in neurological disorders / A. Pišlar, J. Kos. – Text : visual // *Mol Neurobiol.* – 2014. – V.49, №2. – P. 1017 – 1030.
206. Plasma antioxidant status, immunoglobulin g oxidation and lipid peroxidation in demented patients: relevance to Alzheimer disease and vascular dementia / M. C. Polidori, P. Mattioli, S. Aldred [et al.]. – Text : visual // *Dement Geriatr Cogn Disord.* – 2004. – V.18, №3-4. – P. 265 – 270.
207. Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / F. Song, A. Poljak, G.A. Smythe, P. Sachdev. – Text : visual // *Brain Res Rev.* – 2009. – V.61, №2. – P. 69 – 80.
208. Plasma cathepsin L: a prognostic marker for pancreatic cancer / N. Singh, P. Das, S. Gupta [et al.]. – Text : visual // *World J Gastroenterol.* – 2014. – V.20, №46. – P. 17532 – 17540.
209. Potential fluid biomarkers for pathological brain changes in Alzheimer's disease: Implication for the screening of cognitive frailty / Q. Ruan, G. D'Onofrio, D. Sancarlo [et al.]. – Text : visual // *Molecular Medicine Reports.* – 2016. – V.14, №4. – P. 3184 – 3198.

210. Proteases Upregulation in Sporadic Alzheimer's Disease Brain / A. Medoro, S. Bartollino, D. Mignogna [et al.]. – Text : visual // *J Alzheimers Dis.* – 2019. – V.68, №3. – P. 931 – 938.
211. Protein aggregation into insoluble deposits protects from oxidative stress / A. Carija, S. Navarro, N. S. de Groot, S. Ventura. – Text : visual // *Redox Biol.* – 2017. – V.12. – P. 699 – 711.
212. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1951. – V.193, №1. – P. 265 – 275.
213. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease / G. Ganguly, S. Chakrabarti, U. Chatterjee, L. Saso. – Text : visual // *Drug Design, Development and Therapy.* – 2017. – V.16, №11. – P. 797 – 810.
214. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury / K. Hensley, K.A. Robinson, S.P. Gabbita [et al.]. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2000. – V.2, №10. – P. 1456 – 1462.
215. Recent Advances in the Treatment of Neurodegenerative Diseases Based on GSH Delivery Systems / I. Cacciatore, L. Baldassarre, E. Fornasari [et al.]. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2012. – V.146. – P. 136 – 148.
216. Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease / A. Le Page, G. Dupuis, E.H. Frost [et al.]. – Text : visual // *Experimental Gerontology.* – 2018. – V.1, №107. – P. 59 – 66.
217. Schechter, I. Cathepsins S, B and L with aminopeptidases display  $\beta$ -secretase activity associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease / I. Schechter, E. Ziv. – Text : visual // *Biol Chem.* – 2011. – V.392, №6. – P. 555 – 569.
218. Screening of Tau Protein Kinase Inhibitors in a Tauopathy-relevant cell-based model of Tau Hyperphosphorylation and Oligomerization / H. Yadikar, I. Torres, G. Aiello [et al.]. – Text : visual // *PLoS One.* – 2020. – V.21, №15(7). – P. e0224952.

219. Search for Alzheimer's disease biomarkers in blood cells: hypotheses-driven approach / J. Wojsiat, K. Laskowska-Kaszub, A. Mietelska-Porowska, U. Wojda. – Text : visual // *Biomark Med.* – 2017. – V.11, №10. – P. 917 – 931.
220. Skoumalova, A. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease / A. Skoumalova, J. Hort. – Text : visual // *Journal of cellular and molecular medicine.* – 2012. – V.16, №10. – P. 2291 – 2300.
221. Spontaneous Isomerization of Long-Lived Proteins Provides a Molecular Mechanism for the Lysosomal Failure Observed in Alzheimer's Disease / T.R. Lambeth, D. L. Riggs, L. E. Talbert [et al.]. – Text : visual // *ACS Central Science.* – 2019. – V.28, №5(8). – P. 1387 – 1395.
222. Stoka, V. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration / V. Stoka, V. Turk, B. Turk. – Text : visual // *Ageing Research Reviews.* – 2016. – № 32. – P. 22 – 37.
223. Stock, A. The role of neutrophil granule proteins in neuroinflammation and Alzheimer's disease / A. Stock, A. Kasus-Jacobi, H.A. Pereira. – Text : visual // *Journal of Neuroinflammation.* – 2018. – V.15. – A. 240.
224. Strategies for detection and quantification of cysteine cathepsins-evolution from bench to bedside / C. S. Hughes, R.E. Burden, B.F. Gilmore, C.J. Scott. – Text : visual // *Biochimie.* – 2016. – №122. – P. 48 – 61.
225. Squier, T.C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging/ T.C. Squier. – Text : visual // *Exp Gerontol.* – 2001. – V.36, №9. – P. 1539 – 1550.
226. Sultana, R. Oxidative modification of brain proteins in Alzheimer's disease: perspective on future studies based on results of redox proteomics studies / R. Sultana, D. Butterfield. – Text : visual // *Alzheimer Disease.* – 2013. – V.33, №1. – P. 243 – 251.
227. Sun, T. Cystatin C-cathepsin B axis regulates amyloid beta levels and associated neuronal deficit in an animal model of Alzheimer's disease / T. Sun, V. Turk, B. Turk. – Text : visual // *Neuron.* – 2008. – V.60. – P. 247 – 257.
228. Swomley, A.M. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics / A. M.

- Swomley, D.A. Butterfield. – Text : visual // Archives of toxicology. – 2015. – V.89, №10. – P. 1669 – 1680.
229. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein / C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger [et al.]. – Text : visual // J Neurosci. – 2006. – V.26, №27. – P. 7212 – 7221.
230. Systemic immune responses in Alzheimer's disease: in vitro mononuclear cell activation and cytokine production / M. Pellicanò, M. Bulati, S. Buffa [et al.]. – Text : visual // Journal of Alzheimer's Disease. – 2010. – V.21, №1. – P. 181–192.
231. Tabassum, R. Potential for therapeutic use of hydrogen sulfide in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases / R. Tabassum, N.Y. Jeong. – Text : visual // Int J Med Sci. – 2019. – V.16, №10. – P. 1386 – 1396.
232. Tasegian, A. Origin of  $\alpha$ -mannosidase in cerebrospinal fluid / A. Tasegian, S. Paciotti, M.R. Ceccarini. – Text : visual // 20th ESGLD Workshop and Graduated Course.– Naples, 2015. – P. 121.
233. Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies / Y. Gao, L. Tan, J.T. Yu, L. Tan. – Text : visual// Current Alzheimer Research. – 2018. – V.15, №3. – P. 283 – 300.
234. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease / L. Martin, X. Latypova, C.M. Wilson [et al.]. – Text : visual // Ageing Research Reviews. – 2013. – V.12, №1. – P. 289 – 309.
235. Thal, D.R. Vascular dementia: different forms of vessel disorders contribute to the development of dementia in the elderly brain / D.R. Thal, L.T. Grinberg, J. Attems. – Text : visual // Exp Gerontol. – 2012. – V.47, №11. – P. 816 – 824.
236. Thapa, A. Dietary Modulation of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease / A. Thapa, N.J. Carroll. – Text : visual // International Journal of Molecular Science. – 2017. – V.18, №7. – P. 1583.
237. The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease / Z. Liu, T. Li, P. Li [et al.]. – Text : visual // Oxidation Medicine Cellular Longev. – 2015. – V.2015. – P. 352 – 273.

238. The antimicrobial protein, CAP37, is upregulated in pyramidal neurons during Alzheimer's disease / A.J. Brock, A. Kasus-Jacobi, M. Lerner [et al.]. – Text : visual // *Histochem Cell Biol.* – 2015. – V.144, №4. – P. 293 – 308.
239. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management / T. Yadati, T. Houben, A. Bitorina, R. Shiri-Sverdlov. – Text : visual // *Cells.* – 2020. – V.9, №7. – P. 1679.
240. The lysosomal function of progranulin, a guardian against neurodegeneration. D. H. Paushter, H. Du, T. Feng, F. Hu. – Text : visual // *Acta Neuropathol.* – 2018. – V.136, №1. – P. 1 – 17.
241. The Post-amyloid Era in Alzheimer's Disease: Trust Your Gut Feeling. *Frontiers / C. Osorio, T. Kanukuntla, E. Diaz [et al.]. – Text : visual // Aging Neuroscience.* – 2019. – V.16. – P. 128 – 143.
242. The Role of Oxidative Damage to Nucleic Acids in the Pathogenesis of Neurological Disease / V. Reddy, A. Beyaz, G. Perry [et al.]. – Text : visual // *Eur. Bioscience.* – 2009. – V.1, №6. – P. 535 – 544.
243. Tiwari, S.C. Alzheimer's Disease Pathology and Oxidative Stress: Possible Therapeutic Options / S.C. Tiwari, R.M. Soni. – Text : visual // *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism.* – 2014. – №4. – P. 5 – 9.
244. Toneff, T. Brain pyroglutamate amyloid- $\beta$  is produced by cathepsin protease inhibitor E64d, representing a potential Alzheimer's disease therapeutic / T. Toneff, M. Kindy, V. Hook. – Text : visual // *J. Alzheimers Dis.* – 2014. – V.41. – P. 129 – 149.
245. Tönnies, E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease / E. Tönnies, E. Trushina. – Text : visual // *Journal Alzheimer's Disease.* – 2017. – V.57, №4. – P. 1105 – 1121.
246. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration / P. Rusmini, K. Cortese, V. Crippa [et al.]. – Text : visual // *Autophagy.* – 2019. – V.15, №4. – P. 631 – 651.
247. Turk, B. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers / B. Turk, D. Turk, V. Turk. – Text : visual // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – V.147, №. 7. – P. 98 – 111.

248. Ueno, M. Elucidation of mechanism of blood-brain barrier damage for prevention and treatment of vascular dementia / M. Ueno. – Text : visual // *Rinsho Shinkeigaku*. – 2017. – V.57, №3. – P. 95 – 109.
249. Umeno, A. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes / A. Umeno, V. Biju, Y. Yoshida. – Text : visual // *Free Radical Research*. – 2017. – V.51, №4. – P. 413 – 427.
250. Unique biological function of cathepsin L in secretory vesicles for biosynthesis of neuropeptides / L. Funkelstein, M. Beinfeld, A. Minokadeh [et al.]. – Text : visual // *Neuropeptides*. – 2010. – V.44, №6. – P. 457 – 466.
251. Vascular inflammation in cerebral small vessel disease / R.P. Rouhl, J. G. Damoiseaux, J. Lodder [et al.]. – Text : visual // *Neurobiol Aging*. – 2012. – V.33, №8. – P. 1800 – 1806.
252. Venkat, P. Models and mechanisms of vascular dementia / P. Venkat, M. Chopp, J. Chen. – Text : visual // *J. Exp. Neurol*. – 2015. – V.272. – P. 97–108.
253. Wenk, G.L. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease / G.L. Wenk. – Text : visual // *J Clin Psychiatry*. – 2003. – V.64, №9. – P. 7 – 10.
254. Whalley, K. Neurodegenerative disease: A neutrophil invasion / K. Whalley. – Text : visual // *Nat Rev Neurosci*. – 2015. – V.16, №9. – P. 510.
255. White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes / S. E. Nasrabady, B. Rizvi, J.E. Goldman [et al.]. – Text : visual // *Acta neuropathol commun*. – 2018. – V.6, №1. – P. 22 – 36.
256. Yan, L.L. How do cells cope with RNA damage and its consequences? / L.L. Yan, H.S. Zaher. – Text : visual // *J Biol Chem*. – 2019. – V.11, №294(41). – P. 15158 – 15171.
257. Yoshida, M. Neurocognitive Disorders Other Than Alzheimer Disease: Vascular Dementia / M. Yoshida. – Text : visual // *Brain Nerve*. – 2018. – V.70, №5. – P. 517 – 531.

258. Zhao, Y. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease / Y. Zhao, B. Zhao. – Text : visual // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2013. – V. 2013. – A. 316523.
259. Zheng, H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid / H. Zheng, E.H. Koo. – Text : visual // Mol Neurodegener. – 2006. – V.1. – P. 5 – 10.
260. Zhiyou, C. Oxidative Stress and  $\beta$ -Amyloid Protein in Alzheimer's Disease / C. Zhiyou, A. Ratka. – Text : visual // NeuroMolecular Medicine. – 2011. – V.13, №4. – P. 223 – 250.
261. Zhu, H. Inflammation caused by peripheral immune cells across into injured mouse blood brain barrier can worsen postoperative cognitive dysfunction induced by isoflurane / H. Zhu, W. Liu, H. Fang. – Text : visual // BMC Cell Biology. – 2018. – V.19. – P. 23 – 30.