

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛИМФОЛОГИИ –
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»**

На правах рукописи

Обанина Наталья Андреевна

**УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА И НЕЙРОНОВ
ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МЕЛАНОМЫ
КОЖИ И ПРИМЕНЕНИИ МОДУЛЯТОРОВ АУТОФАГИИ**

1.5.22 – клеточная биология

Диссертация

**на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

**доктор биологических наук,
профессор
Бгатова Наталия Петровна**

Новосибирск – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Меланома кожи: патогенез, системные эффекты и экспериментальное моделирование	14
1.2 Молекулярно-клеточная организация и функциональные свойства гематоэнцефалического барьера	16
1.3 Нейробиологические аспекты системного влияния опухолевого процесса	26
1.4 Молекулярная организация и регуляция процесса аутофагии	29
1.5 Литий: молекулярные мишени и нейропротекторные эффекты	33
1.6 Хлорохин как блокатор лизосомальной функции и аутофагического потока	36
1.7 Заключение по литературному обзору	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	38
2.1 Реагенты	38
2.2 Экспериментальные животные	38
2.3 Иммуногистохимическое окрашивание и световая микроскопия	40
2.4 Иммунофлуоресцентное исследование	40
2.5 Трансмиссионная электронная микроскопия	41
2.6 Морфометрический анализ	41
2.7 Статистическая обработка данных	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
3.1 Ультраструктура пирамидных нейронов префронтальной коры при моделировании меланомы кожи	44
3.2 Структурная организация гематоэнцефалического барьера префронтальной коры при меланоме кожи	49
3.3 Ультраструктурная перестройка пирамидных нейронов при применении карбоната лития	54
3.4 Влияние карбоната лития на гематоэнцефалический барьер	58
3.5 Влияние хлорохина на ультраструктуру пирамидных нейронов ...	60

3.6 Структура компонентов гематоэнцефалического барьера при применении хлорохина	64
3.7 Анализ экспрессии фактора гипоксии и нейротрофического фактора мозга в префронтальной коре при моделировании меланомы кожи	67
3.8 Фактор гипоксии HIF1 α и нейротрофический фактор BDNF в префронтальной коре при применении карбоната лития	69
3.9 Экспрессия HIF1 α и BDNF в префронтальной коре при применении хлорохина при меланоме	71
3.10 Сравнительный анализ изменений в нейронах префронтальной коры и компонентах гематоэнцефалического барьера между исследуемыми группами	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
ВЫВОДЫ	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Меланома кожи представляет собой одну из наиболее агрессивных и метастазирующих злокачественных опухолей, характеризующуюся ростом заболеваемости во всем мире. Несмотря на значительные успехи в области иммунной и таргетной терапии, существенной проблемой остаются системные эффекты заболевания, в частности – его воздействие на центральную нервную систему (ЦНС) (Caraviello C. et al., 2025).

Показано, что опухолевые клетки и клетки микроокружения продуцируют медиаторы воспаления, которые попадают в кровообращение, что приводит к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и нейровоспалению (Schrepf A. et al., 2015). Повреждение ГЭБ и эндотелия кровеносных капилляров, а также дисфункция корковых нейронов могут привести к изменению нейрональной пластичности, нарушению когнитивных функций и депрессии (Santos J.C., Pyter L.M., 2018).

В связи с уникальной структурой и высокой метаболической потребностью нейронов для поддержания гомеостаза клеток мозга критически важным процессом является аутофагия. Аутофагия действует как защитный механизм, позволяя нейронам адаптироваться к воздействию различных стрессоров, включая окислительный стресс и нейротоксичность, разрушая поврежденные клеточные компоненты и способствуя выживанию клеток. Нарушение регуляции аутофагии связывается с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера и боковой амиотрофический склероз (БАС) (Thal D.R. et al., 2024).

Одним из общепринятых нейропротекторов является карбонат лития. Имеются данные о том, что литий влияет на экспрессию генов цитокинов в клетках мозга, в частности, способен ингибировать ИЛ-1 β и ФНО- α и усиливать синтез ИЛ-2 и ИЛ-10 (Valvassori S.S. et al., 2017), а также способствует индукции синтеза ИЛ-4 и ИЛ-6 (Madireddy S., Madireddy S., 2022).

Литий играет важную роль в функционировании нервной системы, способствуя нейрогенезу, синаптической пластичности и выживанию клеток

(Kerr F. et al., 2018). Он является признанным нейропротекторным препаратом для лечения нейродегенеративных расстройств (Malhi G.S. et al., 2012; Jope R.S., Nemeroff C.B., 2016). Кроме того, литий способен индуцировать процесс аутофагии, усиливая деградацию белков при нейродегенеративных заболеваниях (Ruffoli R. et al., 2015). Принятым блокатором аутофагии является хлорохин. Эффект хлорохина обусловлен слабоосновными аминами, входящими в его структуру, и выражается в повышении значения pH лизосом, подавлении активности кислых гидролаз, снижении ферментативной активности, а также нарушении слияния лизосом с аутофагосомами, что в целом приводит к угнетению процесса аутофагии (Pedrioli G. et al., 2020).

Однако малоизученным является состояние нейронов и гематоэнцефалического барьера при моделировании меланомы кожи и воздействии модуляторов процесса аутофагии.

Степень разработанности темы исследования. К настоящему времени установлено, что у пациентов с меланомой и другими солидными опухолями развивается комплекс когнитивных и аффективных нарушений. Патогенез этого синдрома, часто обозначаемого как «раковая энцефалопатия», связывают с хроническим системным воспалением, индуцированным опухолью и ее микроокружением (Mujinya R. et al., 2025). Роль провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6) в дестабилизации гематоэнцефалического барьера, инициации нейровоспаления и нарушении синаптической пластичности подтверждена в ряде экспериментальных моделей (Schagen S.B. et al., 2014; Versele R. et al., 2022).

Отдельным, глубоко разработанным направлением является исследование аутофагии как ключевого механизма поддержания гомеостаза и выживания нейронов при стрессе. Нарушение регуляции этого процесса – устоявшийся фактор в патогенезе нейродегенеративных заболеваний (Guo F. et al., 2018; Nixon R.A., Rubinsztein D.C., 2024). В связи с этим значительный научный интерес представляют соединения, способные модулировать аутофагию. Карбо-

нат лития признан классическим индуктором аутофагии (через истощение инозитола и ингибирование mTOR), обладающим доказанными нейропротекторными, противовоспалительными и пролиферативными свойствами в моделях нейродегенерации (Puglisi-Allegra S. et al., 2023; Kerr F. et al., 2018). Примечательно, что появляются данные о его возможном позитивном влиянии на течение меланомы (Taskaeva I. et al., 2022) и когнитивный статус пациентов (Asgari M.M. et al., 2017; Пронин А.В. и др., 2017). Хлорохин, в свою очередь, является стандартным ингибитором поздних стадий аутофагии за счет алкализации лизосом и широко используется как исследовательский инструмент (Pedrioli G. et al., 2020).

Несмотря на эти данные, ультраструктурные изменения нейронов и компонентов гематоэнцефалического барьера как при опухолевом росте, так и на фоне воздействия лития, остаются недостаточно изученными. В частности, неясны конкретные субклеточные преобразования, лежащие в основе дисфункции мозга при периферической онкопатологии, и возможные пути их коррекции. Таким образом, проведение исследования, направленного на анализ структурной организации нейронов и гематоэнцефалического барьера коры головного мозга в условиях опухолевого роста и при воздействии лития, представляется научно актуальным и обоснованным.

Цель исследования:

Выявить структурно-функциональные изменения нейронов и гематоэнцефалического барьера префронтальной коры головного мозга в условиях моделирования меланомы кожи и применения модуляторов аутофагии.

Задачи исследования:

1. Изучить ультраструктурную организацию нейронов префронтальной коры головного мозга животных при моделировании меланомы кожи.
2. Проанализировать влияние индуктора аутофагии карбоната лития и ингибитора аутофагии хлорохина на ультраструктуру пирамидных нейронов префронтальной коры интактных животных и при моделировании опухолевого роста.

3. Оценить уровни аутофагии в пирамидных нейронах до и после использования модуляторов аутофагии у интактных животных и при моделировании меланомы кожи методами трансмиссионной электронной микроскопии, иммунофлуоресценции и морфометрии.

4. Определить содержание синаптических везикул и экспрессию синаптофизина в пресинаптических структурах нейронов префронтальной коры в исследуемых группах с помощью морфометрического и иммунофлуоресцентного анализа.

5. Исследовать ультраструктурную организацию гематоэнцефалического барьера и экспрессию аквапорина 4 (AQP4) в префронтальной коре головного мозга животных при моделировании меланомы кожи и введении карбоната лития и хлорохина.

6. Оценить экспрессию нейротрофического фактора мозга BDNF и фактора гипоксии HIF1 α в префронтальной коре головного мозга животных при моделировании меланомы кожи и введении карбоната лития и хлорохина.

Научная новизна. Впервые показано действие карбоната лития на нейроны интактных животных, приводящее к уменьшению объемной плотности митохондрий и ЭПР со структурными нарушениями, снижению неопушенных и опущенных клатрином везикул, увеличению количества синапсов и экспрессии синаптофизина.

Впервые в модели меланомы кожи в пирамидных нейронах префронтальной коры отмечено значительное повышение объемной плотности митохондрий с деструктивными изменениями крист и расширение цистерн гранулярного ЭПР, что является ультраструктурными признаками окислительного стресса и стресса ЭПР.

Впервые проанализирована ультраструктура компонентов гематоэнцефалического барьера префронтальной коры при моделировании меланомы кожи. Выявлены структурные признаки повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера, связанные с увеличением экспрессии AQP4 и повыше-

нием объемной плотности транспортных везикул эндотелиоцитов. Впервые отмечено, что карбонат лития способствует восстановлению структурно-функционального состояния ГЭБ.

Впервые показано, что в пирамидных нейронах префронтальной коры при моделировании меланомы кожи происходит изменение соотношения аутофагических структур: преобладание аутофагосом и повышение уровня белка-маркера аутофагии LC3 β , что может отражать дисбаланс в системе утилизации клеточных компонентов и нарушение процесса аутофагии. Выявлено, что карбонат лития способствует восстановлению баланса между аутофагическими структурами и снижению объемной плотности деструктивных органелл.

Теоретическая и практическая значимость работы. В проведенном исследовании получены новые знания, дополняющие современные представления о морфофункциональных изменениях пирамидных нейронов и компонентов гематоэнцефалического барьера в условиях моделирования меланомы кожи и воздействии препаратов, модулирующих аутофагию. Совокупность полученных результатов исследования может стать теоретической основой для дальнейших экспериментальных и клинических исследований, необходимых для разработки новых подходов для комплексного лечения и защиты нейронов при периферическом опухолевом росте, а также для расширения показаний применения карбоната лития для профилактики и лечения депрессивных состояний у онкобольных.

Методология и методы исследования. Для достижения поставленных цели и задач была использована экспериментальная модель меланомы кожи. Объектом исследования служили фрагменты префронтальной коры экспериментальных животных с привитой подкожно опухолью и получавших карбонат лития и хлорохин в качестве регуляторов процесса аутофагии. В ходе работы были использованы современные методы исследования: трансмиссионная электронная микроскопия, морфометрический, иммунофлуоресцентный, иммуногистохимический и статистический анализ. Оценивали ультраструктурные

изменения в пирамидных нейронах и компонентах гематоэнцефалического барьера в условиях моделирования меланомы кожи и применения карбоната лития и хлорохина (оценка количественной и объемной плотности органелл), а также анализировали экспрессию маркеров аутофагии (LC3 β), гипоксии (HIF1 α), проницаемости ГЭБ (AQP4), нейротрофического фактора мозга (BDNF).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Первичная меланома кожи вызывает каскад структурно-функциональных нарушений в префронтальной коре головного мозга: развитие гипоксии, нарушение структуры гематоэнцефалического барьера и нейронов префронтальной коры экспериментальных животных.

2. Введение индуктора аутофагии карбоната лития в условиях моделирования меланомы кожи оказывает комплексное нейропротекторное и корректирующее действие на структуру гематоэнцефалического барьера и ультраструктуру нейронов.

3. Введение ингибитора аутофагии хлорохина при первичной меланоме кожи не обеспечивает полноценной нейропротекции, усугубляя патологические изменения за счет блокирования аутофагии и накопления липофусциновых телец.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием общепринятой модели меланомы кожи у мышей. В работе применены современные морфологические методы – электронная микроскопия, морфометрия, иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный анализ, что позволило комплексно оценить структурно-функциональные изменения нейронов и компонентов гематоэнцефалического барьера. Исследования выполнены на сертифицированном оборудовании с использованием стандартизированных протоколов и реактивов. Корректность и объективность данных подтверждаются адекватным использованием контрольных групп, достаточной численностью выборки и применением современных методов статистической обработки. Интерпретация резуль-

татов выполнена с учетом современных представлений клеточной биологии, нейробиологии и онкологии. Полученные данные согласуются с литературными источниками и расширяют представления о влиянии лития на нейроны и структуру гематоэнцефалического барьера при меланоме.

Апробация работы. Результаты работы представлены в виде постерных и устных докладов на: The Thirteenth International Multiconference: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022) (Новосибирск, 2022); 2022 Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB) (Новосибирск, 2022); 2022 IEEE International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences (SIBIRCON) (Новосибирск – Екатеринбург, 2022); XV международной научно-практической конференции имени академика Ю.И. Бородина «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (Новосибирск, 2023); VI инновационном Петербургском медицинском форуме «Медицина 2023 – наука, инновации и практика» (Санкт-Петербург, 2023); Конференции с международным участием «Фундаментальные исследования в онкологии 2023» (Ростов-на-Дону, 2023); IX Молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2024); 2024 IEEE International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences (SIBIRCON) (Новосибирск, 2024); XVI научно-практической конференции с международным участием «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» имени академика Ю.И. Бородина (Новосибирск, 2025), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные исследования – базис трансляционной онкологии» (Ростов-на-Дону, 2025); 15th International Multiconference: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2026) (Новосибирск, 2026).

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 14 работ, из них 3 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

1. Obanina N., Bgatova N., Taskaeva I., Makarova V. Effect of rapamycin and lithium carbonate on depression-like behavior and anxiety in skin melanoma // 2022 IEEE International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences (SIBIRCON), Yekaterinburg, Russian Federation. – 2022. – P. 400–403. DOI: 10.1109/SIBIRCON56155.2022.10017116.
2. Bgatova N., Lomakin A., Taskaeva I., Obanina N., Makarova V., Letyagin A. Structural Basis of Skin Melanoma Metastasis // 2022 Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB). – 2022. – P. 340–342. DOI: 10.1109/CSGB56354.2022.9865414.
3. Obanina N.A., Bgatova N.P. ER stress in mice prefrontal cortex pyramidal neurons in peripheral tumor growth // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference, 04–08 July 2022, Novosibirsk, Russia. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2022. – P. 821–822. DOI: 10.18699/SBB-2022-477.
4. Obanina N.A., Bgatova N.P. The influence of a peripheral tumor on the behavior of animals and the structure of neurons in the prefrontal cortex // *Cardiometry*. – 2023. – № 29. – P. 26–27.
5. Обанина Н.А., Бгатова Н.П. Карбонат лития повышает экспрессию нейротрофического фактора BDNF в префронтальной коре головного мозга при меланоме кожи // VI Инновационный Петербургский медицинский форум «Медицина 2023 – наука, инновации и практика», 18–20 мая 2023, Санкт-Петербург. – Трансляционная медицина. – Приложение 2. – С. 77.
6. Обанина Н.А., Бгатова Н.П. Снижение энергетической функции пирамидных нейронов префронтальной коры при меланоме кожи // *Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям: Материалы XV Международной научно-практической конференции им. академика Ю.И.Бородина, 24–25 марта 2023, Новосибирск*. – Новосибирск: ИПЦ НГМУ, 2023. – С. 231–234.
7. Obanina N.A., Bgatova N.P., Ivanov I.D. Neurons Structure and Cytokine Expression after Lithium Carbonate Treatment on Melanoma Mice Model // **Cell and Tissue Biology**. – 2024. – Vol. 18, № 5. – P. 549–560. DOI: 10.1134/S1990519X2470041X
8. Obanina N., Bgatova N. Effect of Lithium and Chloroquine on Neuronal Ultrastructure in a Melanoma Mice Model // 2024 IEEE International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences (SIBIRCON), Novosibirsk, Russian Federation. — 2024. — P. 131–134. DOI: 10.1109/SIBIRCON63777.2024.10758443
9. Обанина Н.А., Бгатова Н.П. Нейропротективное действие карбоната лития при моделировании меланомы // Материалы IX Молодежной школы-конференции по молеку-

лярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 15–18 октября 2024. – СПб: Астерион, 2024. – С. 199–200.

10. Обанина Н.А., Бгатова Н.П. Экспрессия AQP4 в префронтальной коре головного мозга при меланоме кожи и применении карбоната лития // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям: Материалы XVI Международной научно-практической конференции им. академика Ю.И.Бородина, 22–23 мая 2025, Новосибирск. – Новосибирск: ИД «Манускрипт», 2025. – С. 143–147.

11. Obanina N.A., Bgatova N.P. Disruption of the Blood-Brain Barrier of the Prefrontal Cortex in Peripheral Tumor Growth and Correction with Lithium Carbonate // **Cell and Tissue Biology**. – 2025. – Vol. 19. – P. 450–457. DOI: 10.1134/S1990519X25600164

12. Обанина Н.А., Бгатова Н.П. Хлорохин снижает стресс эндоплазматического ретикула в нейронах при меланоме кожи // Фундаментальные исследования – базис трансляционной онкологии: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные исследования – базис трансляционной онкологии», Ростов-на-Дону, 23-24 октября 2025. – М.: Изд-во «Кредо», 2025. – С. 94-96.

13. Obanina N., Bgatova N. Chloroquine modulates AQP4 expression and glymphatic function in melanoma B16 // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2026): 15th International Multiconference, 06–11 July 2026, Novosibirsk, Russia. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2026 – P. 1489–1491. DOI: 10.18699/bgrs2026-1492.

14. Obanina N., Bgatova N. Chloroquine-induced ultrastructural changes in pyramidal neurons in experimental melanoma // **Biological Communications**. – 2026. Vol. 71, №1. – P. 23–31. DOI: 10.21638/spbu03.2026.103.

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в планировании дизайна исследования, проведении экспериментальной части, заборе материала и пробоподготовке. Автором самостоятельно выполнено иммуногистохимическое, иммунофлуоресцентное окрашивание, электронно-микроскопическое исследование, морфометрический и статистический анализ. Самостоятельно проведен анализ литературы, интерпретация основных результатов, подготовлена рукопись диссертации.

Благодарности

Автор благодарит своего научного руководителя – д.б.н., профессора Бгатову Наталию Петровну за ценные консультации и поддержку в организации и проведении исследования и подготовке диссертационной работы. Кроме того, автор выражает благодарность коллегам из лаборатории ультраструктурных исследований НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН за помощь в проведении исследования: Таскаевой Ю.С., Шатрук А.Ю., Макаровой В.В., Торбеевой Е.В., Детковой В.Ф. Автор благодарит сотрудников лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН за предоставление клеточной культуры Меланомы В16. Часть работы была выполнена на оборудовании ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, и автор выражает благодарность его сотрудникам Розину В.Г., Алешиной Т.Е. за техническую помощь.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Меланома кожи: патогенез, системные эффекты и экспериментальное моделирование

1.1.1 Эпидемиология, этиология и патогенез меланомы кожи

С каждым годом меланома кожи диагностируется чаще других форм рака. Она является чрезвычайно злокачественной опухолью и характеризуется быстрым ростом (Dzwierzynski W.W., 2021). Меланома развивается из кожных меланоцитов, расположенных в базальном слое эпидермиса. Основным фактором кожного меланогенеза служит ультрафиолетовое излучение (УФ-излучение), нанося прямое повреждение ДНК, а также ускоряя онкогенез (Teixido C. et al., 2021). К факторам риска развития меланомы относятся наличие невусов, генетическая предрасположенность, а также семейный анамнез меланомы. Около 25% меланом кожи возникают из невусов (Bevona C. et al., 2003). На предрасположенность к меланоме наибольшее влияние оказывают полиморфизмы гена рецептора меланокортина 1 (MC1R) (Teixido C. et al., 2021). Таким образом, меланома кожи отличается не только высокой злокачественностью, но и сложной многофакторной природой, что делает ее серьезной проблемой современной онкологии. Особую значимость приобретает изучение ее взаимодействия с другими системами организма, в частности с центральной нервной системой.

1.1.2 Механизмы повреждения центральной нервной системы, опосредованные меланомой кожи

Одним из частых и разрушительных осложнений меланомы кожи является развитие метастазов в центральную нервную систему, включая головной мозг (Saberian C. et al., 2021). Однако не только метастазы могут нарушить гомеостаз центральной нервной системы (ЦНС) в условиях онкопатологии. Токсичные вещества и провоспалительные цитокины, продуцируемые опухолью, могут переноситься током крови и лимфы и приводить к поражению органов ЦНС. Таким образом, взаимодействие между опухолью и мозгом представляет

собой сложный процесс, включающий как прямое воздействие опухолевых факторов на мозг, так и обратное влияние ЦНС на прогрессию опухоли через нейронные сети и гормональные механизмы (Chen X. et al., 2024). Предполагается, что повреждение гематоэнцефалического барьера и эндотелия кровеносных капилляров, а также нарушение функции нейронов коры головного мозга может привести к изменению нейронной пластичности, нарушению когнитивных функций и депрессии (Santos J.C., Pyter L.M., 2018).

1.1.3 Характеристика экспериментальной модели меланомы B16

Меланома B16 является одной из наиболее часто используемых моделей опухоли (Overwijk W.W., Restifo N.P., 2001). Первоначально она возникла спонтанно в коже у основания уха мыши линии C57BL/6 в 1954 году. В последующие годы из нее были выведены несколько субклонов (B16F0, B16F1, B16F10), различающихся по скорости роста и метастатическому потенциалу. Наибольшее распространение в экспериментальной онкологии получил подштамм B16F10, который характеризуется высокой инвазивностью и преимущественным метастазированием в легкие при внутривенном введении, а также способностью к спонтанному метастазированию при подкожной или внутримышечной имплантации (Shen K. et al., 2023).

Для моделирования опухолевого процесса, наиболее приближенного к клинической ситуации, чаще всего используется подкожная имплантация клеток меланомы (Stribbling S.M., Ryan A.J., 2022). Согласно стандартным протоколам, мышам C57BL/6 в возрасте 6–8 недель подкожно в область бедра или спины вводят $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ клеток меланомы B16F10 в 0,1 мл физиологического раствора. Опухоль становится пальпируемой на 5–7 день, достигает объема 500–1000 мм³ к 14–21 дню, после чего у животных развиваются признаки кахексии, системного воспаления и поведенческих изменений (Overwijk, W. W., & Restifo, N. P. (2001).

Важно отметить, что модель B16F10 воспроизводит ключевые паранеопластические синдромы, характерные для меланомы человека. В сыворотке

крови мышей с подкожной меланомой B16F10 повышается уровень провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и активных форм кислорода (Siveen K.S., Kuttan G., 2013). Кроме того, у таких животных описаны нарушения поведения, сходные с депрессивноподобными и когнитивными расстройствами у онкологических пациентов (Lebeña A. et al., 2014; Ge H. et al., 2025). Таким образом, модель подкожной меланомы B16F10 является адекватным инструментом для изучения системного влияния периферической опухоли на центральную нервную систему, включая ультраструктурные изменения нейронов и гематоэнцефалического барьера.

1.2 Молекулярно-клеточная организация и функциональные свойства гематоэнцефалического барьера

1.2.1 Исторические этапы изучения гематоэнцефалического барьера

Изучение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) началось в конце XVII века. Хамфри Ридли первым исследовал сосудистую систему мозга, заметив меньшую проницаемость мелких сосудов по сравнению с периферическими (Ridley H., 1695). Однако его открытия не были осознаны до конца XIX века. В 1885 году Пауль Эрлих экспериментировал с красителями и обнаружил, что мозг и спинномозговая жидкость остаются неокрашенными, что указывало на возможное существование барьера между кровью и мозгом (Ehrlich P., 1885).

Эти наблюдения положили начало формированию представлений о ГЭБ. В дальнейшем они получили развитие: в 1900 году Левандовский повторил эксперименты Эрлиха и предложил термин «гематоэнцефалический барьер» (Levandowsky M., 1900). В 1921 году Лина Штерн расширила понимание функций барьера, указав на его защитную роль, участие в снабжении мозга необходимыми веществами для его метаболизма и поддержании гомеостаза мозга (Villabona-Rueda A. et al., 2019).

К 1920-м годам существование барьера было доказано экспериментально, а вторая половина XX века принесла качественный прорыв благодаря

развитию электронной микроскопии. В 1955–1967 гг. исследования позволили детально описать строение барьера и показать ключевую роль эндотелиальных клеток, астроцитов и плотных контактов в его формировании (Dempsey E.W., Wislocki G.B., 1955; Luse S.A., 1956; Reese T.S., Karnovsky M.J., 1967).

В дальнейшем появились модели *in vitro*, такие как изолированные капилляры мозга и культуры эндотелиоцитов, которые помогли изучить механизмы транспортировки веществ через ГЭБ и подчеркнули важность взаимодействия между эндотелиальными и глиальными клетками для поддержания свойств ГЭБ (Oldendorf W.H., 1971; Betz A.L., Goldstein G.W., 1978; DeBault L.E., Cancilla P.A., 1980).

1.2.2 Клеточные и молекулярные компоненты гематоэнцефалического барьера

Современные представления рассматривают ГЭБ как многокомпонентную систему, которая обеспечивает избирательную проницаемость между кровью и центральной нервной системой (ЦНС). Он играет ключевую роль в поддержании гомеостаза мозга, предотвращая проникновение токсичных веществ и патогенов. Эта функция достигается благодаря тесному взаимодействию различных компонентов нейроваскулярной единицы: эндотелиальных клеток капилляров, перицитов, астроцитов и базальной мембраны (Sweeney M.D. et al., 2019).

Эндотелиоциты. Основным элементом ГЭБ – эндотелиальные клетки, выстилающие микрососуды мозга. Эти клетки отличаются от сосудистого эндотелия в периферических органах отсутствием фенестр, плотными соединениями, а также сниженной активностью макропиноцитоза и кавеоларного трансцитоза (Banks W.A. et al., 2021). Эндотелиальные клетки мозга экспрессируют низкие уровни молекул, участвующих в адгезии лейкоцитов, таких как Е- и Р-селектины, ICAM-1 и VCAM-1, что ограничивает миграцию иммунных клеток в мозг. Кроме того, эти клетки обладают специализированными транспортными системами, которые контролируют приток полярных питательных

веществ (например, через транспортеры семейства SLC) и отток токсичных веществ (например, через Р-гликопротеин и другие транспортеры семейства ABC) (Morris M.E. et al., 2017).

Значимую роль в функционировании ГЭБ играют плотные контакты между эндотелиальными клетками. Они состоят из нескольких молекул, включая окклюдины, клаудины и молекулы адгезии контактов (например, JAM-1). Эти молекулы образуют непрерывность капилляра, предотвращая параклеточную диффузию молекул через барьер. Молекулы, такие как ZO-1, связывают плотные контакты с цитоскелетом эндотелиальных клеток, а JAM-1 участвует в адгезии между клетками и миграции лейкоцитов. Нарушение этих молекул может быть связано с повышенной проницаемостью ГЭБ, что, в свою очередь, может усугубить патологии, такие как нейровоспаление и окислительный стресс (Aragón-González A. et al., 2022).

Гликокаликс, покрывающий поверхность эндотелиальных клеток, играет ключевую роль в барьерной функции ГЭБ. Состоящий из гликозаминогликанов (гепарансульфат, хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота), гликокаликс выполняет функцию молекулярного сита, ограничивая проникновение молекул с массой более 40 кДа (Kutuzov N. et al., 2018). Его отрицательный заряд способствует ингибированию проникновения отрицательно заряженных белков плазмы, таких как альбумин. Исследования показывают, что гликокаликс в мозге является более плотным барьером по сравнению с другими органами, такими как сердце и легкие (Ando Y. et al., 2018).

Перициты. Перициты играют важную роль в поддержании целостности ГЭБ. Они регулируют диаметр капилляров, а также участвуют в экспрессии белков плотных контактов, поддерживая барьерную функцию эндотелиальных клеток. Количество перицитов, а также их связь с эндотелиальными клетками, оказывает влияние на проницаемость ГЭБ. Уменьшение числа перицитов связано с увеличением проницаемости ГЭБ и может способствовать патологиям, таким как нейродегенерация и старение (Castro Dias M. et al., 2019).

Базальная мембрана. Важным компонентом гематоэнцефалического барьера является базальная мембрана (БМ), представляющая собой аморфную, но высокоорганизованную внеклеточную матрицу. Основная функция БМ заключается в поддержке структуры, закреплении клеток и передаче сигнала. Базальная мембрана играет ключевую роль в определении проницаемости ГЭБ для различных клеток, включая лейкоциты. Коллаген IV, фибронектин и ламинин являются наиболее важными биохимическими компонентами БМ, обеспечивающими ее структурную стабильность. Коллаген IV поддерживает стабильность мембраны, в то время как фибронектин играет важную роль в стимуляции пролиферации и выживания эндотелиальных клеток, что подтверждается эмбриональными летальными моделями с дефицитом фибронектина и коллагена IV (Reed M.J. et al., 2019).

Взаимодействие между клетками и компонентами БМ через рецепторы, такие как дистрогликаны и интегрины, регулирует миграцию клеток, пролиферацию и их выживание, что непосредственно влияет на барьерную функцию ГЭБ. Например, отсутствие астроцитарных ламининов у мышей с условным нокаутом приводит к разрушению ГЭБ из-за снижения уровня белков плотных контактов (Aragón-González A. et al., 2022). Также деградация коллагена IV и ламининов сопровождается увеличением утечек через ГЭБ (Chen T. et al., 2024). Нарушение сигнальных путей, связанных с интегринами, также приводит к дезорганизации плотных контактов и повышению проницаемости ГЭБ (Halder S.K. et al., 2023). Исследования показывают, что разрушение БМ является важным механизмом, который предшествует патологическим изменениям, таким как нейродегенерация и старение (Galea I., 2021).

Астроциты. Астроциты участвуют в формировании и поддержании гематоэнцефалического барьера. Их отростки образуют периваскулярные ножки, которые плотно охватывают капилляры мозга, обеспечивая структурную поддержку и регулируя проницаемость барьера. Взаимодействие астроцитов с эндотелиальными клетками ГЭБ осуществляется через различные

молекулы, включая ангиотензиноген, ангиопоэтин-1 и трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), которые влияют на экспрессию белков плотных контактов, таких как окклюдин и ZO-1, регулируя таким образом проницаемость барьера (Manu D.R. et al., 2023).

Общепринятым маркером астроцитов считается глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Он представляет собой белок промежуточных филаментов типа III, который существует в нескольких изоформах – α , γ , δ/ϵ и κ у человека, а у грызунов дополнительно встречается изоформа β . Изоформа α является наиболее распространенной. Основная функция GFAP – обеспечение механической поддержки астроцитов и поддержание структуры ГЭБ (Jurga A.M. et al., 2021). Повышенная экспрессия GFAP является индикатором глиоза, связанного с повреждением мозга или патологией (Messing A., Brenner M., 2020).

Аквапорин-4 (AQP4) является основным водным каналом, экспрессируемым в астроцитарных ножках, и играет ключевую роль в регуляции водного обмена в мозге. AQP4 регулирует как отток, так и приток жидкости в мозг (Vandebroek A., Yasui M., 2020). При патологических состояниях, таких как цитотоксический отек, AQP4 способствует накоплению жидкости в астроцитах, тогда как при вазогенном отеке он способствует оттоку жидкости, помогая предотвратить отек мозга (Galea I., 2021).

Таким образом, ГЭБ представляет собой не отдельный слой, а интегрированную систему, в которой разные клеточные элементы и внеклеточные структуры взаимно усиливают барьерную функцию. Эти особенности напрямую связаны с механизмами транспорта веществ через барьер.

1.2.3 Механизмы транспорта веществ через гематоэнцефалический барьер

Благодаря своей липофильной природе ГЭБ избирательно пропускает молекулы с молекулярной массой менее 400 Да, ограничивая проникновение полярных питательных веществ (Jena L. et al., 2020). Его транспортная функция основана на сочетании пассивной диффузии, селективных транспортеров

и транцитоза, что обеспечивает как поступление питательных веществ, так и выведение метаболитов (Abbott N.J. et al., 2010). На рисунке 1 представлены основные типы транспорта через гематоэнцефалический барьер.

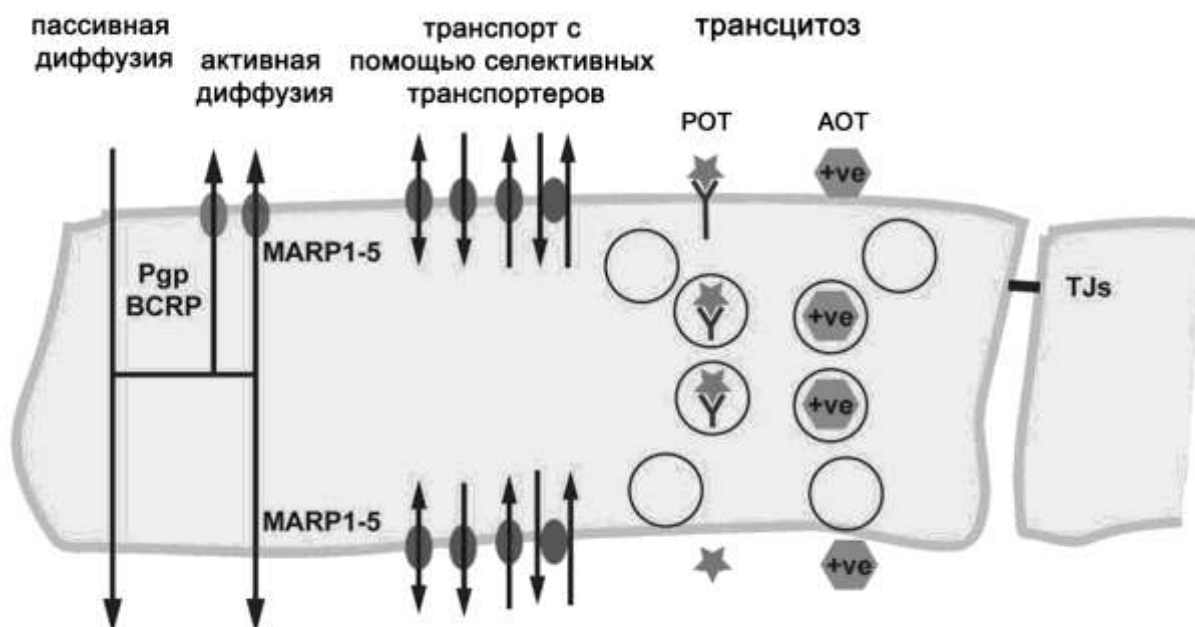


Рисунок 1. Механизмы транспорта веществ через гематоэнцефалический барьер. POT – рецептор-опосредованный транцитоз, AOT – адсорбционно-опосредованный транцитоз. Адаптировано из Kadry H., et al., 2020.

Плотные контакты эндотелиоцитов разделяют транспортеры на аблюминальную и люминальную поверхности мембраны, что предотвращает их перемещение и поддерживает полярность. Помимо пассивного транспорта через ГЭБ, молекулы могут перемещаться посредством ионных каналов и селективных транспортеров. Механизмы транспорта можно разделить на эндотелиальный и перичитарный, включая активный отток, ионный транспорт, рецептор-опосредованный (POT) и адсорбционно-опосредованный транцитоз (AOT) (Sweeney M.D. et al., 2019).

Основные транспортеры ГЭБ делятся на эффлюксные транспортеры (например, ABC и EEAT), которые переносят липофильные соединения, и транспортеры питательных веществ, регулирующие обмен питательных

веществ и удаление отходов. Например, глюкоза и аминокислоты транспортируются через барьер с помощью специфических переносчиков, обеспечивающих питание для мозга (Wu D. et al., 2023).

Транспортеры ГЭБ и их роль в регуляции проницаемости

ГЭБ выполняет динамичную роль, обеспечивая поступление питательных веществ и выведение метаболитов для поддержания гомеостаза мозга. Барьер пропускает газообразные молекулы (O_2 , CO_2 , N_2) и молекулы с молекулярной массой ниже 400-500 Да, а также молекулы, которые могут образовывать водородные связи (<8-10 водородных связей) (Meng F. et al., 2021).

Для транспорта растворенных веществ и метаболитов эндотелиальные клетки ГЭБ используют транспортеры, включая SLC (суперсемейство переносчиков), которые регулируют усвоение питательных веществ, таких как глюкоза и аминокислоты, ионный транспорт, а также транцитоз (Zaragozá R., 2020; Nguyen Y.T.K. et al., 2021). Среди SLC выделяются переносчики, такие как SLC2A1 (Glut1), который транспортирует глюкозу, и SLC7A5 (LAT1), который переносит аминокислоты в ЦНС. Недавние исследования показывают, что дефекты этих транспортеров могут приводить к нарушениям ГЭБ и нейродегенеративным заболеваниям (Vulturar R. et al., 2022).

ABC-транспортеры действуют как эффлюксные насосы, защищая мозг от токсичных молекул, перенося жирорастворимые соединения обратно в кровь. Примером является Р-гликопротеин (Pgp), который активно отводит молекулы, ограничивая проницаемость для токсинов через ГЭБ. Нарушение работы этих транспортеров может влиять на проникновение препаратов в мозг (Wu D. et al., 2023).

Трансцитоз

ГЭБ отличается низкими показателями транцитоза, который необходим для доставки определенных питательных веществ и веществ с большой молекулярной массой в мозг, удовлетворяя его метаболические потребности (Ayloo

S., Gu C., 2019). Процесс транцитоза включает три основных этапа: эндоцитоз, внутриклеточный везикулярный транспорт и экзоцитоз.

Существуют два основных типа транцитоза: рецептор-опосредованный транцитоз (РОТ) и адсорбционно-опосредованный транцитоз (АОТ). В процессе РОТ рецепторы на люминальной поверхности клеток связываются с лигандами или их грузами, что инициирует их проникновение и последующую транспортировку к аблюминальной стороне эндотелиальных клеток. В то время как при АОТ соединение проникает путем прямых взаимодействий между лигандом и гликокаликсом эндотелиоцита. РОТ позволяет переносить крупные молекулы, такие как рецепторы инсулина и трансферрина, в мозг, в то время как АОТ способствует поглощению катионных молекул, липидов, альбумина и наночастиц (Erickson M.A., Banks W.A., 2018).

Ионный транспорт

Для поддержания ионного гомеостаза ГЭБ содержит ионные транспортеры, которые регулируют градиенты ионов, таких как Na^+ , K^+ , Cl^- и Ca^{2+} . Например, Na^+ - K^+ - Cl^- котранспортер регулирует поступление ионов натрия, калия и хлорида, а Na^+ - K^+ -АТФаза контролирует отток ионов калия. Нарушения в этих транспортерах могут привести к патологическим последствиям, таким как отек и повреждение клеток (Zhang J. et al., 2017).

Таким образом, транспорт через ГЭБ – это динамический процесс, в котором задействованы как молекулярные переносчики, так и механизмы транцитоза и ионного обмена. Однако при патологических состояниях эти процессы могут нарушаться, что приводит к изменению проницаемости барьера.

1.2.4 Механизмы нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера

Нарушение барьерной функции ГЭБ связано с изменениями в работе его ключевых компонентов – от белков плотных контактов и транспортеров до базальной мембраны и астроцитарных каналов.

Изменения плотных контактов

Снижение экспрессии ключевых белков плотных контактов – клаудина-5, окклюдина и ZO-1 – является одной из основных причин повышения параклеточной проницаемости ГЭБ (Chen T. et al., 2024). Эти изменения могут быть индуцированы провоспалительными цитокинами (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ) и активными формами кислорода (АФК). Фактор некроза опухоли α (ФНО- α) нарушает целостность ГЭБ, уменьшая количество белков плотных контактов через сигнальные пути NF- κ B и PI3K. Он также увеличивает параклеточную проницаемость и транцитоз посредством активации ERK1/2 (Takata F. et al., 2021). ИЛ-6 и ИЛ-17 действуют синергетически с ФНО- α , усиливая дисфункцию ГЭБ, в то время как активные формы кислорода (АФК), генерируемые НАДФН-оксидазой, способствуют разрушению плотных контактов (Voirin A.C. et al., 2020).

В условиях ишемии мозга отмечается нарушение гематоэнцефлического барьера путем увеличения экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в нейронах, астроцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках (Hu Y. et al., 2022). VEGF связывается с рецепторами (VEGFR-1, VEGFR-2) на эндотелиальных клетках головного мозга, снижая экспрессию ключевых белков плотных контактов, таких как клаудин-5 и окклюдин, что уменьшает трансэндотелиальное электрическое сопротивление и увеличивает параклеточную проницаемость (Argaw A.T. et al., 2009).

Роль матриксных металлопротеиназ (ММП)

Матриксные металлопротеиназы, особенно ММП-2 и ММП-9, играют ключевую роль в деградации белков плотных контактов и компонентов базальной мембраны. При ишемии, травме мозга и нейровоспалении наблюдается повышение активности ММП, что приводит к обратимому открытию ГЭБ (Yang Y., Rosenberg G.A., 2011). При меланоме кожи также описано повышение активности ММП-9 в сыворотке крови и опухоли (Redondo P. et al., 2005), что может способствовать повышению проницаемости эндотелиальных барьеров, включая ГЭБ (Turner R.J., Sharp F.R., 2016).

Роль транцитоза

В последние годы все больше внимания уделяется роли транцитоза в регуляции проницаемости ГЭБ. Системная абляция гена *Mfsd2a* у мышей, кодирующего белок, подавляющий кавеоллярный транцитоз, приводит к повышению проницаемости ГЭБ за счет увеличения числа кавеол и везикулярного трафика (Andreone B.J. et al., 2017). После травмы мозга повышение числа везикул и активация транцитоза в эндотелиальных клетках способствует гиперпроницаемости ГЭБ, что предшествует деградации белков плотных контактов (Erickson M.A., Banks W.A., 2018). Трансферриновый рецептор 1 (TfR1), расположенный на апикальной мембране эндотелиоцитов, в норме обеспечивает рецептор-опосредованный транцитоз трансферрина. Однако при патологических состояниях, включая нейровоспаление и опухолевый рост, экспрессия TfR1 может повышаться, что вносит дополнительный вклад в усиление транцитоза и повышение проницаемости ГЭБ (Nielsen S.S.E. et al., 2023).

AQP4 и отек мозга

Аквапорин-4, экспрессируемый на периваскулярных ножках астроцитов, играет ключевую роль в регуляции водного гомеостаза мозга. При патологических состояниях, сопровождающихся отеком мозга, экспрессия AQP4 может повышаться, что способствует накоплению жидкости в астроцитах (цитотоксический отек) или, напротив, ее оттоку (вазогенный отек) (Li Y. et al., 2025).

Таким образом, ГЭБ представляет собой сложную многокомпонентную систему, и его дисфункция при периферическом опухолевом росте может быть обусловлена несколькими взаимосвязанными механизмами: снижением экспрессии белков плотных контактов под действием цитокинов и АФК, активацией ММП и транцитоза, а также изменением экспрессии AQP4. Понимание этих механизмов необходимо для интерпретации ультраструктурных изменений, выявляемых в настоящем исследовании.

1.3 Нейробиологические аспекты системного влияния опухолевого процесса

1.3.1 Префронтальная кора: структурно-функциональная организация и уязвимость при системной патологии

В условиях онкопатологии особую роль играет взаимодействие опухоли с центральной нервной системой. Как уже отмечалось, метастазы меланомы кожи часто поражают головной мозг, однако патологическое воздействие на ЦНС не ограничивается метастатическим процессом. Цитокины, хемокины и другие опухолевые медиаторы, проникая через поврежденный гематоэнцефалический барьер, могут нарушать работу нейронов и глиальных клеток, способствовать нейровоспалению и изменению синаптической пластичности (Santos J.C., Pyter L.M., 2018; Chen X. et al., 2024).

В связи с этим для понимания механизмов, определяющих влияние опухолевого процесса на ЦНС, особый интерес представляет изучение структур и функций головного мозга, прежде всего префронтальной коры – региона, участвующего в регуляции основных когнитивных функций, включая планирование, принятие решений, регуляцию поведения и эмоциональную обработку (Hrvoj-Mihic B., Semendeferi K., 2019; Bgatova N. et al., 2024). Нарушения в ее строении и функциях часто сопровождают широкий спектр психиатрических и неврологических состояний. Так, по данным Pitman A. и соавт. (2018), у 20% онкологических больных развивается депрессия, что существенно ухудшает качество жизни и клинический прогноз. Кроме того, изменения в префронтальной коре отмечают при тревоге, шизофрении и болезни Паркинсона (Xu P., 2019), что подчеркивает ее критическую роль в поддержании эмоционального и когнитивного гомеостаза.

Пирамидные нейроны являются наиболее распространенным типом нейронов неокортекса (Ramaswamy B. et al., 2015). Это крупные нейроны пирамидной формы, характеризующиеся, в отличие от остальных типов нейронов коры, цитоплазмой с низкой электронной плотностью. Особый интерес представляет V слой префронтальной коры, пирамидные нейроны которого имеют

наибольшую синаптическую связь с другими пирамидными нейронами и обладают самой высокой степенью рекуррентной связи (Munz M. et al., 2023). Они являются важной частью трансталамического пути корково-корковых взаимодействий и играют ключевую роль в рабочей памяти и исполнительных функциях (Kolomeets N.S., Uranova N.A., 2022). Повреждение или дисфункция этих нейронов ведет к снижению когнитивных способностей и нарушению поведения, что делает их объектом пристального внимания при изучении нейропатологических эффектов онкопатологии и лекарственных вмешательств.

1.3.2 Роль цитокинов в модуляции функций центральной нервной системы

Важную роль в функции мозга играют межклеточные взаимодействия. В состав ткани мозга помимо нейронов входят астроциты, микроглия, олигодендроциты и эндотелиальные клетки, а в условиях патологии возрастает количество макрофагов, лимфоцитов и нейтрофилов. Цитокины и хемокины, продуцируемые как иммунными, так и глиальными клетками и нейронами, выполняют роль ключевых медиаторов межклеточной коммуникации и участвуют в поддержании гомеостаза ЦНС (Minami M., 2001).

В патофизиологических условиях воспалительные цитокины, в частности интерлейкин-1 (ИЛ-1), фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) и интерлейкин-6 (ИЛ-6), способствуют развитию нейровоспаления и ассоциируются с дегенеративными и психическими нарушениями (Zhang L. et al., 2023; Mallick R. et al., 2025). Повышенное содержание ИЛ-1 и ФНО- α в фрагментах мозга связано с нарушениями синаптической активности, прогрессированием нейродегенерации и изменениями в поведении. В случаях острых повреждений (инсульт, черепно-мозговая травма) выраженный выброс цитокинов способствует усугублению нейронального повреждения и осложняет процесс восстановления (Schimmel S.J. et al., 2017). При этом цитокины участвуют в сложных сетях обратной связи, плеiotропных взаимодействиях и длительной модуляции синаптической пластичности (Prieto G.A., Cotman C.W., 2017).

1.3.3 Митохондриальная дисфункция и стресс эндоплазматического ретикулума в нейронах при системном воспалении

Нейроны, в частности пирамидные нейроны префронтальной коры, характеризуются исключительно высокими энергетическими потребностями, что делает их уязвимыми к нарушениям функции митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭПР). При системном воспалении провоспалительные цитокины и активные формы кислорода (АФК) способны вызывать повреждение этих органелл, что вносит вклад в нейрональную дисфункцию (Casaril A. M. et al., 2021; van Horssen J. et al., 2019).

Митохондрии являются основными источниками АТФ в нейронах и играют ключевую роль в регуляции внутриклеточного кальция, апоптоза и продукции АФК. Ультраструктурно здоровые митохондрии имеют овальную или удлинённую форму, четко ориентированные кристы и электронно-плотный матрикс (Файрушина А.И., Хисматуллина З.Р., 2025). Важным механизмом митохондриального повреждения при воспалении является ингибирование комплексов дыхательной цепи (особенно комплекса I) под действием оксида азота (NO) и АФК (Riobó N.A. et al., 2001). Кроме того, провоспалительные цитокины, посредством активации NF-κB, подавляют экспрессию PGC-1α – ключевого транскрипционного коактиватора, управляющего митохондриальным биогенезом, что приводит к уменьшению количества митохондрий и их функциональной недостаточности (Rius-Pérez S. et al., 2020). В экспериментальных моделях системного воспаления (введение липополисахарида) описано увеличение доли митохондрий с деструктивными изменениями в нейронах (Lee Y. et al., 2024).

ЭПР является основной внутриклеточной органеллой, ответственной за синтез, сворачивание и посттрансляционную модификацию секреторных и мембранных белков. Нарушение гомеостаза ЭПР (накопление неправильно свернутых белков) активирует сигнальные пути ответа на неправильно свернутые белки (UPR; unfolded protein response), которые в норме восстанавливают функцию ЭПР, но при хронической активации могут приводить к апоптозу (Senft D., Ronai Z.A., 2015).

Основными индукторами стресса ЭПР в нейронах при системном воспалении являются гипоксия, нарушение кальциевого гомеостаза, окислительный стресс и действие провоспалительных цитокинов (Dmytriv T.R. et al., 2024). ФНО- α и ИЛ-1 β способны нарушать работу Ca^{2+} -АТФаз ЭПР, что приводит к истощению внутриклеточных депо кальция и активации UPR (Duncan D.J. et al., 2010).

Ультраструктурным эквивалентом стресса ЭПР является расширение цистерн ЭПР. В норме цистерны ЭПР имеют узкий щелевидный просвет (30–50 нм). При стрессе просвет расширяется до 100–300 нм и более, мембраны могут терять четкость контуров (Дедов И.И. и соавт., 2012). Расширение цистерн ЭПР описано в нейронах при нейродегенеративных заболеваниях, ишемии, черепно-мозговой травме и системном воспалении (Chavez-Valdez R. et al., 2016; Shi M. et al., 2022).

Таким образом, развитие меланомы кожи сопровождается системным влиянием на центральную нервную систему, в частности посредством изменения цитокиновой среды мозговой ткани. Это может приводить к повреждению гематоэнцефалического барьера, что в свою очередь отрицательно сказывается на функции нейронов коры головного мозга. В условиях таких повреждений особый интерес представляет аутофагия как универсальный клеточный механизм, регулирующий выживание и адаптацию нейронов при стрессе.

1.4 Молекулярная организация и регуляция процесса аутофагии

Аутофагия является эволюционно консервативным механизмом внутриклеточной деградации поврежденных белков и органелл, необходимым для поддержания клеточного гомеостаза (Scrivo A. et al., 2018). Термин «аутофагия» был введен бельгийским биохимиком Кристианом де Дювом в 1963 году. Последующие молекулярные исследования привели к присуждению Нобелевской премии Есинори Осуми в 2016 году, что повысило интерес к данной теме (Mizushima N., 2017). В нервной системе аутофагия особенно важна, поскольку нейроны являются постмитотическими и зависят от эффективных

систем контроля качества для удаления агрегированных белков и дефектных органелл; ее нарушение связано с развитием нейродегенеративных заболеваний (Filippone A. et al., 2022).

1.4.1 Ключевые этапы макроаутофагии

Различают микроаутофагию, макроаутофагию и шаперон-опосредованную аутофагию. Процесс микроаутофагии, при котором происходит попадание в лизосому (путем инвагинации ее мембран) макромолекул и обломков клеточных мембран, довольно подробно охарактеризован у дрожжей и практически не встречается у млекопитающих (Yim W.W., Mizushima N., 2020). Шаперон-опосредованная аутофагия (ШОА) отличается от микроаутофагии тем, что для идентификации она использует не мембранные структуры, а шапероны, которые содержат определенный пентапептидный мотив. В отличие от микроаутофагии и ШОА, в процессе макроаутофагии происходит обособление субстрата и последующая его транспортировка в лизосому с помощью вновь синтезированных двумембранных везикул – аутофагосом (Parzych K.R., Klionsky D.J., 2014).

Выделяют основные стадии процесса макроаутофагии: инициация, нуклеация, элонгация, секвестрация (обособление), слияние с лизосомами и ферментативное расщепление (Liu Z.Y. et al., 2024) (рис. 2). На стадии инициации внутри клетки образуется фагофор – изолированный участок цитоплазматической мембраны. Далее он расширяется и, в конце концов, полностью изолирует участок цитоплазмы или органеллу, образуется двумембранная везикула – аутофагосома. Аутофагосомы сливаются со зрелыми эндосомами, образуя одномембранные амфисомы. Последние сливаются с лизосомами, в результате чего формируется аутолизосома. Содержимое аутолизосом постепенно разрушается под воздействием ферментов (Lim S.H.Y. et al., 2024).

Макроаутофагия инициируется путем фосфорилирования определенных компонентов комплекса киназ ULK1 (ULK1, ULK2, FIP200, ATG13, ATG101) (Parzych K.R., Klionsky D.J., 2014). Под влиянием гипоксии, ЭПР-стресса, пониженного содержания аминокислот и АТФ, а также дефицита факторов роста

фосфорилирование комплекса ULK1 прекращается (Barmaki H. et al., 2023), активируя фосфорилирование других компонентов данного комплекса (ULK2, FIP200, ATG13, ATG101) и Beclin-1, что запускает образование комплекса фосфатидилинозитол-3-ОН-киназы класса III (PI3K CIII) (в состав которого входят белки Vps34, p150, Beclin-1, ATG14), и формирование преаутофагосомы (Mercer T.J. et al., 2018).

Vps34 играет главную роль в синтезе фосфатидилинозитолтрифосфата (PI3P) для удлинения фагофора и привлечения белков комплекса ATG12–ATG5–ATG16L1 через WIPI-белки. Удлинение фагофора опосредуется двумя системами убиквитиноподобных (UBL) белков: первая – ATG12-ATG5-ATG16L1, вторая – LC3 β , конъюгированный с фосфатидилэтаноламином (LC3 β -II) (Parzych K.R., Klionsky D.J., 2014; Sporbeck K. et al., 2015; Mercer T.J. et al., 2018).

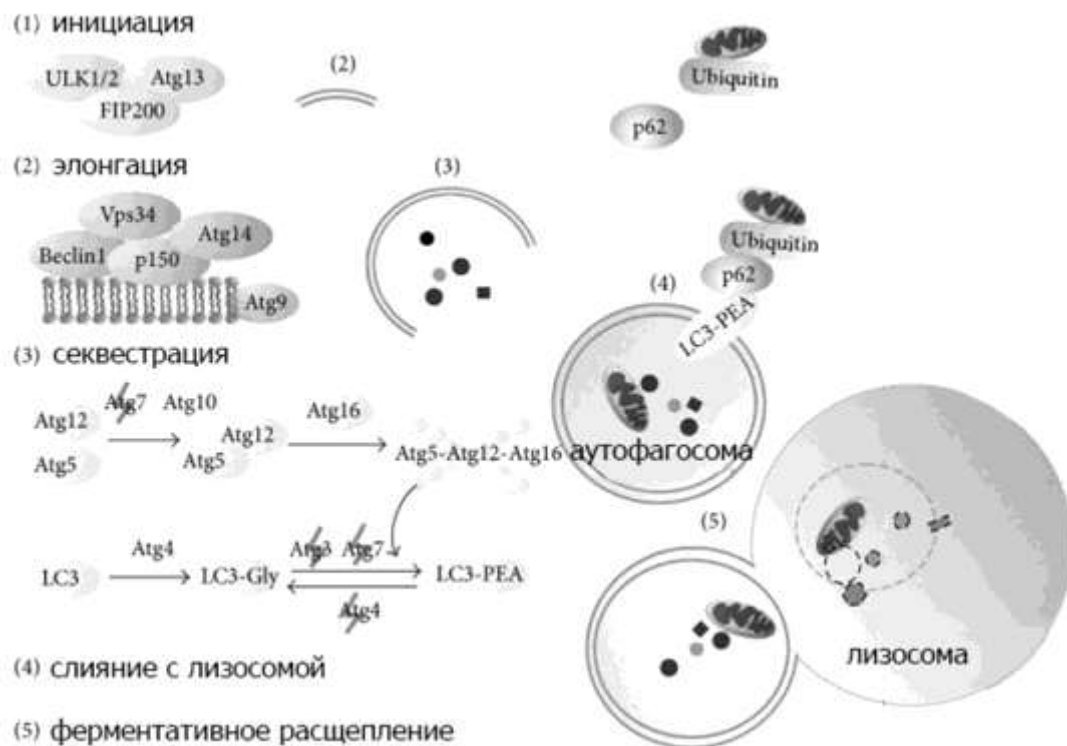


Рисунок 2. Схематическое представление процесса макроаутофагии. Адаптировано из Wu F. et al., 2015.

ATG9 доставляет компоненты к формирующейся аутофагосоме, его динамика регулируется ULK1 и WIPI2 (Mercer T.J. et al., 2018). После образования полных аутофагических везикул зрелая аутофагосома сливается с лизосо-

мой, образуя аутолизосому, где обособленные молекулы и органеллы разрушаются (Ke P.Y., 2024). Миграция и слияние аутофагосом с эндосомами и лизосомами осуществляется через SNARE-белки (VAMP3, VAMP7) и Rab ГТФазы, а Beclin-1 участвует в созревании аутофагосом. Последним этапом является возвращение метаболитов в цитозоль посредством пермеаз (Byrnes K. et al., 2022; Ke P.Y., 2024).

Селективная аутофагия позволяет избирательно удалять митохондрии (митофагия), эндоплазматический ретикулум (ретикулофагия), пероксисомы, агрегаты белков и патогены. Митофагия, опосредованная PINK1-Parkin, служит примером селективного пути: PINK1 активируется при потере мембранного потенциала митохондрий и привлекает Parkin, что ведет к убиквитинилированию наружной мембранной белковой сети и последующему распознаванию адапторами (p62/SQSTM1, NDP52 и др.), связывающимися с LC3 β -II (Gatica D. et al., 2018). Нарушения в генах PARK2 и PINK1 у людей приводят к дефектам митофагии и ассоциированы с формами болезни Паркинсона (Jin S.M., Youle R.J., 2012).

1.4.2 Фармакологическая и метаболическая регуляция аутофагии

Основным путем регуляции аутофагии, известным на сегодняшний день, является ингибирование mTORC1 (ингибитора комплекса ULK1) рапамицином. Связываясь с mTORC1, рапамицин инактивирует его, не давая взаимодействовать с комплексом ULK1, что приводит к активации аутофагии.

АМФК – основная энергетическая чувствительная киназа в клетке, которая способна реагировать на внутриклеточный уровень АМФ/АТФ для регуляции различных клеточных процессов, включая макроаутофагию (Parzych K.R., Klionsky D.J., 2014). Она способна ингибировать mTORC1 и фосфорилировать ULK1, что привлекает ATG9 к LC3 β -II на мембране аутофагосомы, тем самым активировать аутофагию (Li Y., Chen Y., 2019).

Также было отмечено, что увеличение концентрации цитозольного Ca²⁺ в результате стресса ЭПР вызывает кальций/кальмодулин-зависимую протеин-

киназу-киназу 2 бета (СAМKK2 /CaMKK β), чтобы активировать АМФК и вызывать макроаутофагию (Parzych K.R., Klionsky D.J., 2014). Ферментативная активность PI3K-III (Vps34) критична для нуклеации фагофора; ее ингибирование 3-метиладенином блокирует образование аутофагосом (Lin W., Xu G., 2018).

Регуляция также осуществляется через взаимодействие Beclin-1 с белком Bcl-2: связка Beclin-1/Bcl-2 подавляет активность PI3K-III и, соответственно, аутофагию, что демонстрирует перекрестное влияние механизмов апоптоза и аутофагии (Cao Z., 2024). Кроме того, образование аутофагосом может блокироваться 3-метиладенином (3-МА), который ингибирует комплекс PI3K-III (Lin W., Xu G., 2018). Практически важным является и фармакологическое вмешательство: слабые основания, такие как хлорохин, повышают pH лизосом, нарушают активность кислых гидролаз и препятствуют слиянию аутофагосом с лизосомами, тем самым блокируя поздние стадии аутофагии (Chen D. et al., 2018; Pedrioli G. et al., 2020).

1.5 Литий: молекулярные мишени и нейропротекторные эффекты

Литий обладает нейропротекторными свойствами, снижает воспаление, стимулирует выделение нейротрофических факторов и способствует нейрогенезу (Gold A.B. et al., 2011). Zhang D. и соавт. (2018) показали, что литий способствует восстановлению неврологической функции и выживанию нервных клеток.

В обзоре Szalach Ł.P. и соавт. (2023) описывается, что действие лития при биполярном расстройстве связано с тремя взаимосвязанными механизмами. 1) литий модулирует нейротрансмиттеры, перестраивая возбуждающую и тормозную системы, снижая возбуждающую глутаматергическую активность. 2) литий проявляет модулирующий эффект на белки, влияющие на клеточный цитоскелет, включая GSK3 β , цАМФ-зависимую киназу и протеинкиназу C, которые способствуют нейронной пластичности, восстановлению настроения и стабилизации (Piguel N.H. et al., 2023). 3) литий посредством вторичных мессенджеров регулирует факторы транскрипции и экспрессию генов.

Ингибирование GSK3 β является основным механизмом нейропротекторного действия лития.

Активация фосфотидилинозитол-3-киназы (PI3K)

В исследовании Nanavati D. и соавт. (2011) показано, что хроническое применение лития и вальпроата натрия снижает уровень миоинозитола и увеличивает концентрацию монофосфатов инозитола в головном мозге крыс. Авторы отмечают, это связано с ингибированием фермента миоинозитолмонофосфатазы, который участвует в цикле фосфоинозитидов. Кроме того, активация пути PI3K фосфорилирует и ингибирует гликогенсинтазу GSK-3 β , что влияет на нейритогенез и межклеточную связь.

Активация серин-треониновой протеинкиназы B (Akt-1)

Литий активирует серин/треонин-протеинкиназу Akt-1, которая, в свою очередь, ингибирует гликогенсинтазу GSK-3 β . Активность Akt-1 критически важна для регуляции путей апоптоза и клеточного выживания (Jung S.R. et al., 2021).

Инозитолмонофосфатаза (ИМФ)

Литий ингибирует ИМФ, фермент, участвующий в расщеплении инозитолфосфатов до свободного инозитола (Sarkar S. et al., 2005). Однако, Parthasarathy L.K. с соавт. (2003) отмечают, что хроническое лечение литием повышает уровень экспрессии ИМФ в головном мозге. Долгое время считалось, что механизм действия лития связан с истощением фосфоинозитола. Однако последние исследования опровергают эту гипотезу. ИМФ играет ключевую роль в активации аутофагии, что, в свою очередь, способствует биогенезу митохондрий в центральной нервной системе (Singh A. et al., 2023).

Гликогенсинтазакиназа 3 β (GSK3 β)

Литий ингибирует GSK3 β несколькими механизмами: 1) посредством активации PI3K и Akt-1, 2) через ингибирование ИМФ, и 3) напрямую при приеме лития в высоких концентрациях. В свою очередь, GSK3 β фосфорилирует различные транскрипционные факторы, регулируя гены, связанные с ростом

клеток, воспалением, нейропротекцией и дифференцировкой, включая AP-1, CREB, HSF-1, NFAT, Мус, wnt/ β -катенин, ССААТ/энхансер-связывающий белок, FoxO3a, ADD1/SREBP1c, NF- κ B и киназу I κ B α (Kurgan N. et al., 2019).

Нейротрофины

Многие исследователи отмечают, что литий увеличивает уровень нейротрофинов в головном мозге, включая BDNF, NGF и NT-3, а также их рецепторов (Munkholm K. et al., 2014; Loch A.A. et al., 2015). Согласно мета-анализу Fernandes B.S. и соавт. (2015), обобщившему данные 52 исследований, у пациентов с биполярным расстройством выявлено снижение уровня BDNF в периферической крови. Долгосрочное лечение литием, по-видимому, способствует восстановлению уровней BDNF в животных моделях депрессии и биполярного расстройства. Однако изменения в уровне нейротрофинов, вызванные литием, не всегда являются стабильными, зависят от дозы и могут изменяться в зависимости от состояния мозга и модели заболевания (Manchia M. et al., 2024).

Механизмы модуляции аутофагии литием

Модуляция аутофагии является важным компонентом нейробиологического действия лития. Ключевым механизмом считается способность лития опосредованно активировать аутофагию через ингибирование ИМФ и последующее истощение пула инозитола. Это приводит к снижению уровня инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), дефициту внутриклеточного кальция и активации АМФК через кальций-кальмодулин-зависимую киназу киназу- β (CaMKK β). Активированная АМФК фосфорилирует и активирует киназу ULK1, инициируя процесс аутофагии (Motoi Y., et al., 2014).

Кроме того, литий способен ингибировать активность киназы GSK3 β (Kurgan N. et al., 2019), что также вносит вклад в регуляцию аутофагического процесса. Ингибирование GSK3 β может способствовать стабилизации транскрипционного фактора TFEB, который является главным регулятором биогенеза лизосом и аутофагии (Гоголева И.В. и соавт., 2022).

Особый интерес представляет способность лития усиливать митофагию – селективную аутофагию поврежденных митохондрий. Литий активирует митофагию, зависимую от киназ PINK1 и паркин. Он стабилизирует PINK1 на внешней мембране деполяризованных митохондрий, что рекрутирует E3-убиквитинлигазу паркин и запускает процесс убиквитинирования митохондриальных белков с последующим их распознаванием и удалением (Wang Q. et al., 2022). Этот механизм имеет прямое отношение к нейропротекции.

Важно отметить, что эффект лития на аутофагию зависит от дозы и времени воздействия. При низких концентрациях литий активирует аутофагию, ингибируя образование фосфатидилинозитолтрифосфата (PIP3). Однако при более высоких дозах он может ингибировать аутофагию, повышая уровень нефосфорилированного β -катенина (Del Grosso A. et al., 2021). В обзоре Kakhki S. и Ahmadi-Soleimani S.M. (2022) подчеркивается, что высокие концентрации лития способны подавлять слияние аутофагосом с лизосомами, тогда как низкие усиливают аутофагию. Таким образом, литий представляет собой тонкий модулятор аутофагического процесса, и его конечное воздействие определяется клеточным контекстом и параметрами дозирования.

1.6 Хлорохин как блокатор лизосомальной функции и аутофагического потока

Если литий рассматривается как стимулятор аутофагии, то хлорохин, напротив, является ее ингибитором. Изначально известный как противомаларийный препарат, он также применяется при ряде аутоиммунных заболеваний (Takei H. et al., 2023). Благодаря липофильной природе хлорохин способен проникать через гематоэнцефалический барьер (Ong W.Y. et al., 2021), что делает его особенно значимым в исследованиях центральной нервной системы.

Действие хлорохина, обусловленное слабоосновными аминами, входящими в его структуру, выражается в повышении значения pH лизосом, угнетении кислых гидролаз, снижении ферментативной активности, а также в нарушении слияния лизосом с аутофагосомами, что в целом приводит к подав-

лению процесса аутофагии (Chen D. et al., 2018; Pedrioli G. et al., 2020). В связи с этим хлорохин рассматривается как потенциальный противоопухолевый агент (Ferreira P.M.P. et al., 2021).

1.7 Заключение по литературному обзору

Анализ литературных данных показывает, что меланома кожи является одной из агрессивных и быстрорастущих злокачественных опухолей со сложным многофакторным патогенезом. Помимо прямого влияния опухоли через метастазы, существуют данные о повреждениях ЦНС посредством токсичных веществ и провоспалительных цитокинов, продуцируемых опухолью.

При различных нейродегенеративных состояниях показано повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, в частности отмечается нарушение структуры плотных контактов эндотелиоцитов ГЭБ, включая снижение клаудина-5, окклюдина и ZO-1, а также повышение экспрессии водного канала астроцитов AQP4. Предполагается данный механизм и при опухолевом развитии.

Литий, благодаря своей способности ингибировать ключевые мишени (ИМФ, GSK3 β) и активировать АМФК-зависимые пути, при нейродегенеративных условиях способен стимулировать адаптивную аутофагию и митофагию, проявляя нейропротекторные свойства. В противоположность этому, хлорохин, блокируя лизосомальную функцию и аутофагический поток, позволяет изучать последствия ингибирования аутофагии в контексте нейронального повреждения.

Описанные литературные данные свидетельствуют, что влияние периферического опухолевого роста на структурную организацию нейронов и гематоэнцефалического барьера коры головного мозга изучено недостаточно, кроме того, нет информации об эффекте применения лития как в условиях нормы, так и при меланоме кожи.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Реагенты

Карбонат лития (ОАО «Новосибирский завод редких металлов», Россия); параформальдегид (Sigma-Aldrich, США); сахароза (PanReas AppliChem, США); раствор Хенкса (Биолот, Россия); осмий тетроксид (OsO_4) (Sigma-Aldrich, США); эпон (Serva, Германия); PBS (фосфатно-солевой буфер в таблетках) (Росмедбио, Россия); Tween 20 (PanReas AppliChem, США); нормальная козья сыворотка (Abcam, Великобритания); первичные поликлональные антитела к BDNF (E-AB-18244, Elabscience, США); первичные поликлональные антитела к HIF1 α (E-AB-31662, Elabscience, США); вторичные поликлональные антитела к IgG кролика, конъюгированные с HRP-полимером (ab214890, Abcam, Великобритания); гематоксилин Майера (Биовитрум, Россия); набор субстратов DAB (ab94665, Abcam, Великобритания); первичные моноклональные антитела к AQP4 (E-AB-22025, Elabscience, США); первичные моноклональные антитела к GFAP (E-AB-22022, Elabscience, США); первичные поликлональные антитела к синаптофизину (SYP) (A6344, Abclonal, Китай); первичные поликлональные антитела к LC3 β (A5618, Abclonal, Китай); вторичные поликлональные антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Flour® 594 (ab150116, Abcam, Великобритания); вторичные поликлональные антитела к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Flour® 488 (E-AB-1055, Elabscience, США); монтирующая среда для иммунофлуоресцентного анализа с DAPI (ab104140, Abcam, Великобритания). Для иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания использовали предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Fisher Scientific, США), покровные стекла (Биовитрум, Россия).

2.2 Экспериментальные животные

Исследование проведено на мышах-самцах линии C57BL/6 в Центре коллективного пользования «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Все экспериментальные процедуры с животными были проведены в соответствии с международ-

ными нормами гуманного обращения с лабораторными животными и с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях» (Директива 86/609/ЕЕС). Дизайн исследования и все манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН (протокол № 156 от 27 февраля 2020). Условия содержания животных соответствовали санитарным требованиям, установленным для ЦКП «Виварий конвенциональных животных» ИЦиГ СО РАН; животные получали стандартный рацион со свободным доступом к пище и воде.

Мышей разделили на 6 групп ($n=8/\text{группа}$): интактные животные (Контроль); контрольные животные, получавшие карбонат лития (Контроль + Li); контрольные животные, получавшие хлорохин (Контроль + CQ); животные с опухолью (Опухоль); животные с опухолью, получавшие карбонат лития (Опухоль + Li); животные с опухолью, получавшие хлорохин (Опухоль + CQ).

Клетки меланомы B16 вводили подкожно в правую паховую область в дозе $1,0 \times 10^6$. После подтверждения пальпируемой опухоли, начиная с 10-го дня после инокуляции опухолевых клеток, в соответствующих группах начали ежедневное введение карбоната лития перорально в дозе 300 мг/кг и хлорохина перорально в дозе 80 мг/кг в течение 7 дней. Далее животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации и производили забор фрагментов префронтальной коры для дальнейшего изучения.

Выбор дозировки и схемы введения карбоната лития основывался на литературных данных в различных исследуемых моделях (Newman S.A. et al., 2017; Pan Y. et al., 2018), а также доказательствах об отсутствии острой токсичности при краткосрочном применении лития в аналогичных дозах (Королев М.А. и соавт., 2020; Taskaeva I. et al., 2023). При выборе дозировки хлорохина руководствовались существующими публикациями фармакокинетических моделей с использованием данного перепарата (Collins K.P. et al., 2018; Masson J.D. et al., 2020).

2.3 Иммуногистохимическое окрашивание и световая микроскопия

Для выполнения световой микроскопии фрагменты префронтальной коры фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обезвоживали в серии спиртов восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике (Волкова О. В., Елецкий Ю. К., 1982). Для иммуногистохимического анализа фиксированные формалином и залитые парафином срезы префронтальной коры депарафинизировали и регидратировали, а затем подвергали термическому извлечению эпитопа в цитратном буфере (pH 6,0). Далее, после блокирования неспецифического связывания, срезы гибридизировали с первичными поликлональными антителами против BDNF (E-AB-18244, Elabscience, США, 1/200) и HIF1 α (E-AB-31662, Elabscience, США, 1/100) в течение ночи при +4°C, трижды промывали PBS по 5 мин, инкубировали с соответствующими вторичными антителами (ab214890, Abcam, Великобритания) и детектировали с помощью набора субстратов DAB (ab94665, Abcam, Великобритания). После гибридизации срезы докрашивали раствором гематоксилина и помещали в монтирующую среду. Цифровые микрофотографии префронтальной коры получали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (ZEISS, Германия) с использованием камеры AxioCam 512 color CCD camera (ZEISS, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.3 (ZEISS, Германия) в Центре коллективного пользования микроскопии биологических объектов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия).

2.4 Иммунофлуоресцентное исследование

Парафиновые срезы префронтальной коры подвергали депарафинизации и регидратации, термическому извлечению эпитопа в цитратном буфере (pH 6,0). Далее срезы гибридизировали с первичными моноклональными антителами к AQP4 (E-AB-22025, Elabscience, США, 1/400), GFAP (E-AB-22022, Elabscience, США, 1/300), SYP (A6344, Abclonal, Китай, 1/100), LC3 β (A5618, Abclonal, Китай, 1/200) в течение 1 часа при +37°C, промывали TBST и инку-

бирова́ли со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Flour® 594 (ab150116, Abcam, Великобритания, 1/200), либо Alexa Flour® 488 (E-AB-1055, Elabscience, США, 1/200), далее заключали в монтирующую среду, содержащую DAPI (ab104140, Abcam, Великобритания). Цифровые микрофотографии префронтальной коры получали с помощью микроскопа Axio Imager.M2 (ZEISS, Германия) с использованием камеры AxioCam MRm CCD (ZEISS, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 (blue edition) (ZEISS, Германия) в Центре коллективного пользования микроскопии биологических объектов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия).

2.5 Трансмиссионная электронная микроскопия

Образцы префронтальной коры фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленного на растворе Хэнкса, в течение суток, дополнительно фиксировали в течение часа в 1% растворе OsO₄ в фосфатном буфере (pH = 7,4), обезвоживали в возрастающей концентрации этанола, и заливали эпоном (Serva, Германия). Из полученных блоков на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия) готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали толуидиновым синим. Затем его изучали под световым микроскопом LEICA DME (Leica Microsystems, Германия) и выбирали необходимые участки для исследования в электронном микроскопе. Из выбранного материала получали ультратонкие срезы (70–100 нм), контрастированные насыщенным водным раствором уранилацетата и цитрата свинца. Микрофотографии пирамидных нейронов получали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония) в Центре микроскопии Института цитологии и генетики СО РАН, Россия.

2.6 Морфометрический анализ

Цифровые микрофотографии пирамидных нейронов V слоя префронтальной коры и эндотелиоцитов кровеносных капилляров анализировали с помощью программного обеспечения Image J (Wayne Rasband, США). При увеличении x30 000 с использованием открытой тест-системы с шагом 85,2

нм в цитоплазме нейронов ($n=30/\text{группа}$) определяли объемную плотность (V_v) неповрежденных митохондрий и митохондрий с деструктивными изменениями, ЭПР и ЭПР с расширенными цистернами, полисом, транспортных везикул, мультивезикулярных телец, подсчитывали клатриновые везикулы, аутофагосомы, аутолизосомы, лизосомы и липофусциновые тельца. Аутофагосомы определяли как структуры, имеющие двойную мембрану и четко идентифицированный изолированный груз (рибосомы, ЭПР и др.). Аутолизосомы представляли собой структуры, содержащие электронно-плотный цитоплазматический материал и/или органеллы, находящиеся на разных стадиях деградации, и имели единственную ограничивающую мембрану. Лизосомы определяли как электронно-плотные структуры с однородным грузом (Klionsky D.J. et al., 2016).

При морфометрическом анализе эндотелиоцитов кровеносных капилляров ($n=25/\text{группа}$) при увеличении $\times 25\,000$, используя открытую тестовую систему с шагом 84,5 нм, подсчитывали объемную плотность (V_v) интактных митохондрий и митохондрий с деструктивными изменениями, ЭПР и ЭПР с расширенными цистернами, полисом, транспортных везикул. Измерение толщины базальной мембраны осуществляли с помощью программного обеспечения ImageJ, где на микрофотографиях с увеличением $\times 25\,000$ проводили замеры в 5 точках. Суммарно на группу приходилось по 100 измерений.

Морфометрический анализ полученных с помощью иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания срезов против BDNF, HIF1 α , AQP4, GFAP, LC3 β , SYP (25 полей зрения в каждой группе, увеличение $\times 400$) также проводили с использованием программы Image J (Wayne Rasband, США). При иммуногистохимическом анализе определяли площадь окрашивания. При иммунофлуоресцентном анализе выявляли интенсивность флуоресценции и количество окрашенных нейронов. Интенсивность флуоресценции (CTCF, скорректированная суммарная флуоресценция) оценивалась по формуле: $CTCF = \text{IntDen} - (\text{Area} \times \text{Mean_background})$, где IntDen – интегрированная

плотность (суммарная интенсивность) сигнала в клетке, Area – площадь клетки (в пикселях), Mean_background – средняя интенсивность фонового сигнала.

2.7 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы Statistica v. 10 (Statsoft, США). Для проверки вариационного ряда на нормальность использовался статистический критерий Колмогорова-Смирнова. Результаты иммунофлуоресцентного, иммуногистохимического и ультраструктурного анализа не соответствовали критериям нормального распределения, поэтому описание количественных характеристик было представлено в виде медианы, а также первого и третьего квартилей – Me (Q1; Q3). Достоверность различий между исследуемыми выборками определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни и критерия Краскела – Уоллиса. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Ультраструктура пирамидных нейронов префронтальной коры при моделировании меланомы кожи

При анализе ультраструктуры пирамидных нейронов префронтальной коры животных группы Опухоль в большинстве митохондрий наблюдали морфологические признаки деструкции. Кристы митохондрий были фрагментированы, их содержание снижалось. Наблюдала митохондрии, кристы которых визуализировались только на периферии органеллы, тогда как центральная зона оставалась свободной от крист. Матрикс деструктивно измененных митохондрий был гомогенным и электронно-прозрачным, в отличие от мелкозернистого электронно-плотного матрикса митохондрий в контроле. Наружная мембрана митохондрий во всех экспериментальных группах была без признаков повреждения и расширения межмембранного пространства. Объемная плотность митохондрий с деструктивными изменениями крист была увеличена в 3,5 раза ($p < 0,0001$), что составляло 48,1% от их общего количества (табл. 1).

Таблица 1. Морфометрический анализ нейронов префронтальной коры в условиях моделирования меланомы кожи, Ме (Q1; Q3)

Параметры (V_v , %)	Группа	
	Контроль	Опухоль
Митохондрии	6,36 (5,47; 8,19)	4,53 (2,58; 6,56) *
Митохондрии с деструктивными изменениями	1,20 (0,00; 1,98)	4,19 (2,90; 6,08) ***
ЭПР	4,47 (3,99; 5,36)	3,15 (2,11; 4,80) *
ЭПР с расширенными цистернами	0,57 (0,27; 1,99)	3,25 (1,22; 5,70) **
Полисомы	29,56 (22,50; 33,79)	24,88 (19,28; 32,58)
Транспортные везикулы	0,63 (0,33; 0,82)	0,53 (0,30; 0,70)
Клатриновые везикулы	0,21 (0,16; 0,39)	0,24 (0,14; 0,31)
Липофусциновые тельца	0,15 (0; 0,54)	0,28 (0; 0,57)

Примечание: V_v – Объемная плотность (%) внутриклеточных органелл интактных животных (Контроль) и животных с опухолью (Опухоль). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контрольной группой.

В группе Опухоль часто отмечали неравномерное расширение просвета цистерн ЭПР ($p=0,0025$) (рис. 3), которое носило очаговый характер. В одних участках цистерны были расширены в 2-3 раза по сравнению с контролем, в других участках той же цистерны сохранялась нормальная ширина. Мембраны расширенных цистерн оставались целостными, их электронная плотность не отличалась от контроля.

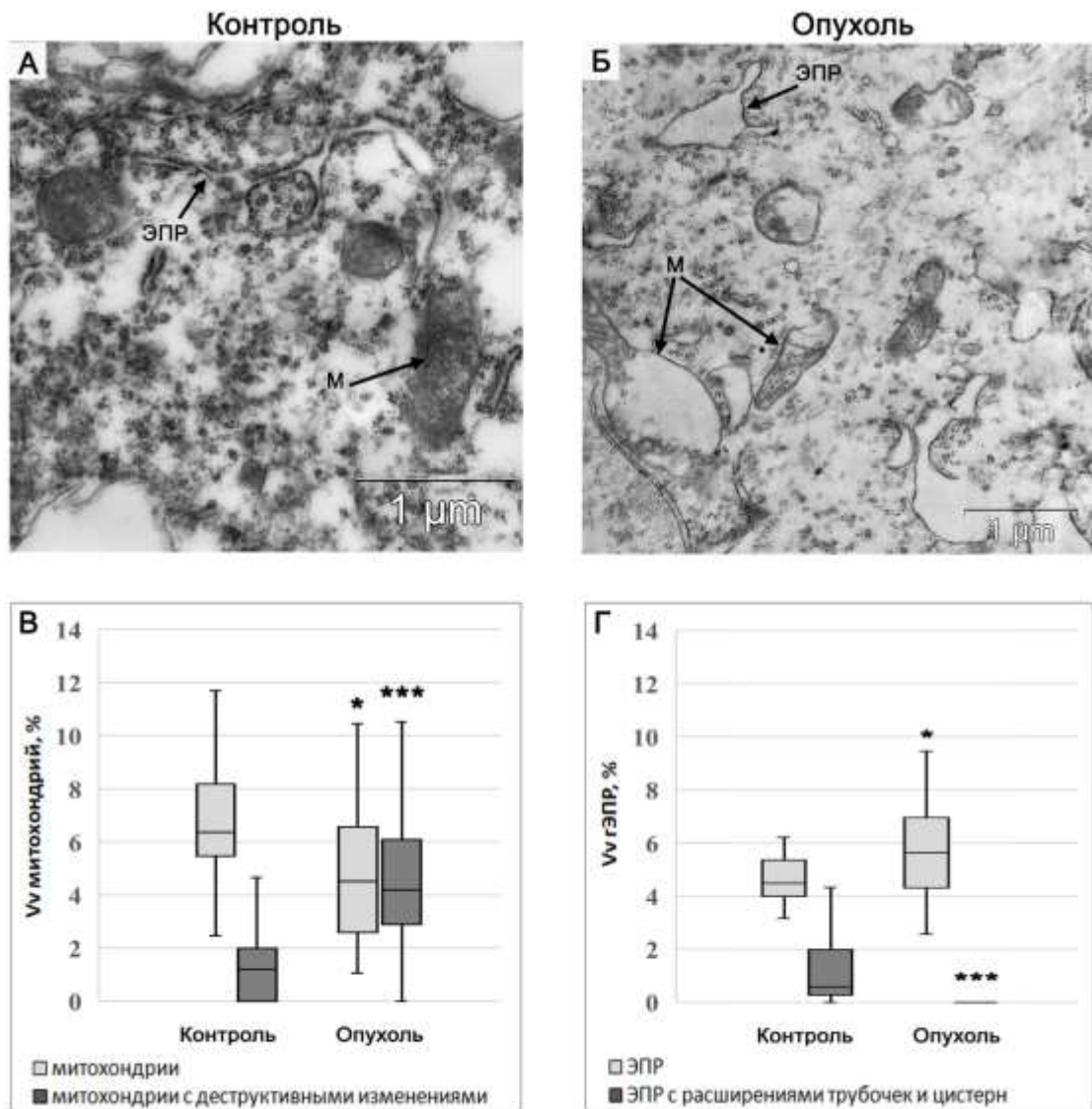


Рисунок 3. Ультраструктура эндоплазматической сети (ЭПР) и митохондрий (М) пирамидных нейронов префронтальной коры intactных животных (Контроль) (А) и животных с опухолью (Опухоль) (Б). ТЕМ. Объемная плотность митохондрий (В) и ЭПР (Г). Me(Q1;Q3). * $p<0,05$; ** $p<0,005$.

При ультраструктурном анализе сомы пирамидных нейронов префронтальной коры свободные полисомы визуализировались в виде скоплений

рибосом, не ассоциированных с мембранами ЭПР. В контрольной группе полисомы были равномерно распределены в цитоплазме, формируя розеткоподобные структуры из 4-8 рибосом. В группе Опухоль отмечали неравномерное распределение полисом, снижение их на периферии клетки, наблюдали и одиночные рибосомы. Объемная плотность свободных полисом в группе Опухоль снизилась на 15,8%.

Транспортные везикулы в соме пирамидных нейронов идентифицировались как мелкие (диаметр 60-80 нм) мембранные пузырьки с электронно-прозрачным содержимым. Клатриновые везикулы отличались наличием электронно-плотного слоя на внутренней поверхности мембраны и слегка варьирующим диаметром (80-100 нм). При сравнении объемной плотности свободных транспортных везикул и клатриновых везикул существенных различий между контролем и группой Опухоль обнаружено не было.

В ходе морфометрического анализа аутофагические структуры в соме пирамидных нейронов классифицировали на три типа в соответствии с их морфологическими признаками: 1) аутофагосомы – вакуоли округлой или неправильной формы, ограниченные двумя мембранами, содержащие фрагменты цитоплазмы (участки ЭПР, отдельные рибосомы, митохондрии) с сохраненной электронной плотностью; аутолизосомы – одномоембранные вакуоли с гетерогенным содержимым, включающим электронно-плотные структуры на разных стадиях деградации (миелиноподобные структуры, остаточные тельца); лизосомы – мелкие (200-500 нм) одномоембранные пузырьки с гомогенным электронно-плотным матриксом, без видимых включений. Морфометрический анализ показал, что достоверных различий в объемной плотности каждой из аутофагических структур между группами не было. Однако выявлено различие в их соотношении (рис. 4).

В группе Контроль преобладали лизосомы, на долю которых приходилось 45,5% от общего числа аутофагических структур. В группе Опухоль соотношение изменилось: аутофагосомы составляли 40,3% всех выявленных аутофагических структур, тогда как доля лизосом снизилась до 21,1%.

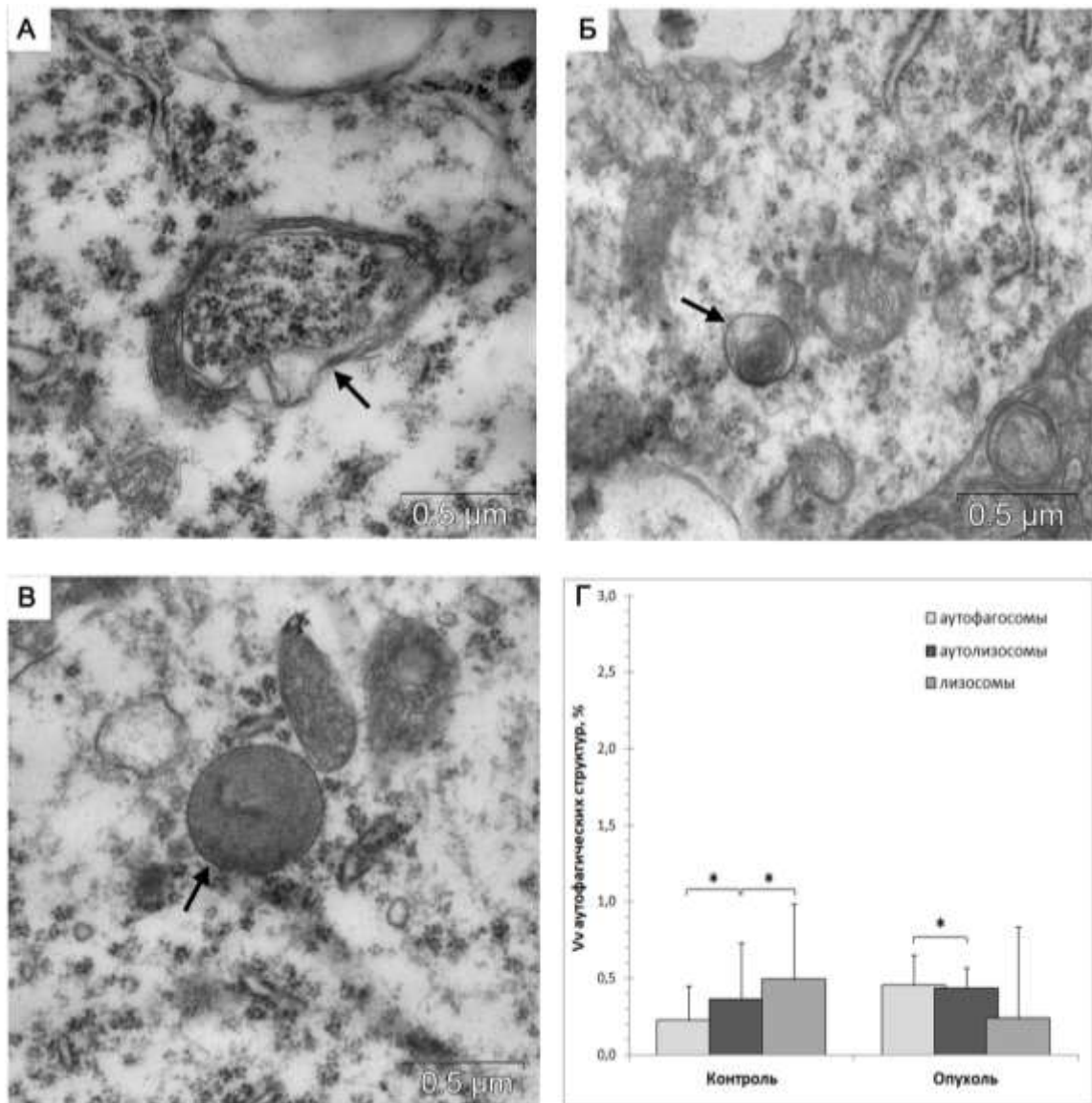


Рисунок 4. Аутофагические структуры в пирамидных нейронах префронтальной коры при меланоме. А – аутофагосомы, Б – аутолизосомы, В – лизосомы, Г – объемная плотность аутофагосом, аутолизосом и лизосом в пирамидных нейронах префронтальной коры intactных животных (Контроль) (А) и животных с опухолью (Опухоль) (Б). $M \pm SD$. * $p < 0,05$.

Для оценки уровня аутофагосом проведен иммунофлуоресцентный анализ на маркер аутофагосом LC3 β . В группе Опухоль отмечали достоверное увеличение в 2,2 раза интенсивности флуоресценции LC3 β в префронтальной коре ($p < 0,0001$) (рис. 5).

При анализе структуры синапсов нейронов в группе Опухоль с помощью морфометрического анализа отмечали достоверное снижение объемной плотности синаптических везикул ($p < 0,0001$).

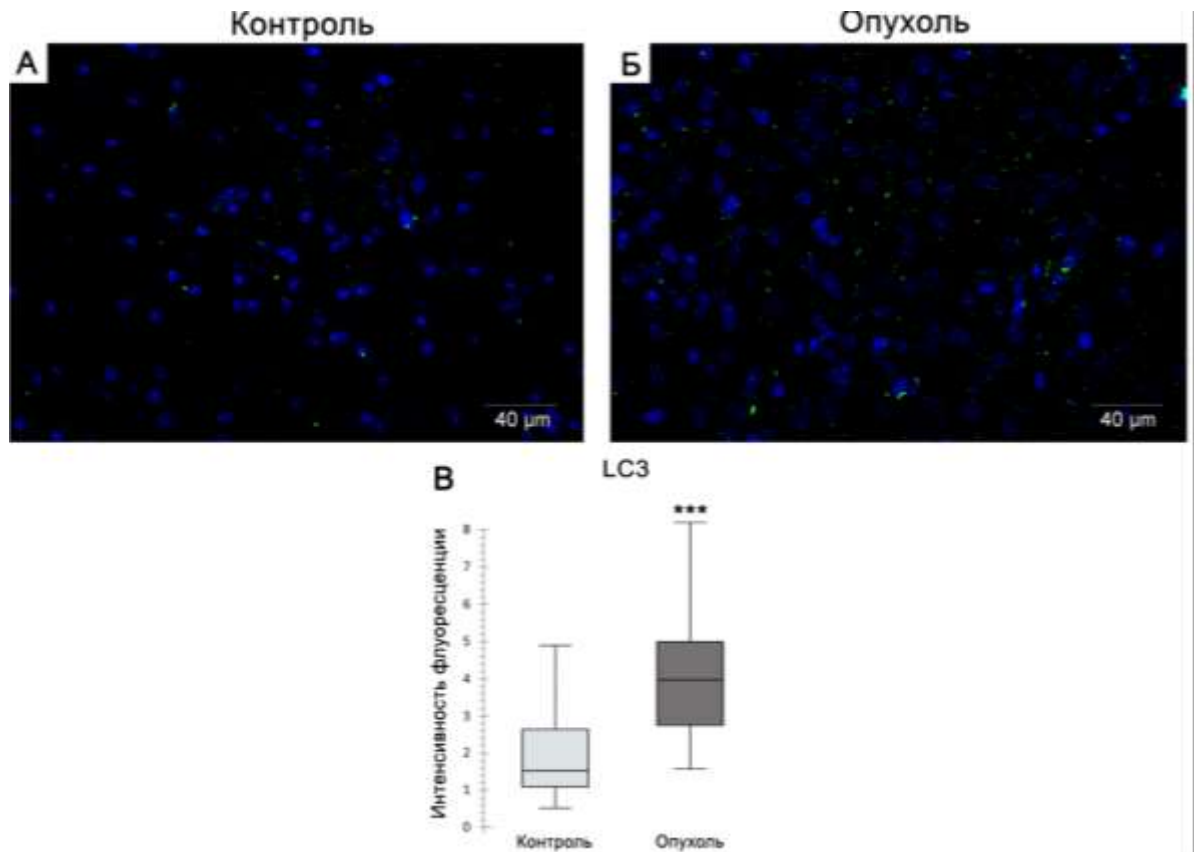


Рисунок 5. Экспрессия маркера аутофагосом LC3β в компонентах префронтальной коры intactных животных (Контроль) (А) и животных с опухолью (Опухоль) (Б). В – интенсивность флуоресценции. Ме (Q1;Q3). *** $p < 0,0005$.

С помощью иммунофлуоресцентного анализа оценивали интенсивность флуоресценции маркера синаптических везикул синаптофизина. Наблюдали трехкратное увеличение интенсивности флуоресценции синаптофизина в группе Опухоль ($p < 0,0001$) (рис. 6).

Резюме

В пирамидных нейронах префронтальной коры в группе Опухоль наблюдали достоверное увеличение объемной плотности митохондрий с деструктивными изменениями и ЭПР с расширенными цистернами, отмечали изменение соотношения аутофагических структур: в группе Опухоль преобладали аутофагосомы, тогда как в контроле – лизосомы. В фрагментах префронтальной коры наблюдали двукратное увеличение экспрессии маркера аутофагосом LC3β. При анализе структуры синапсов нейронов префронтальной коры в группе Опухоль отмечали снижение объемной плотности синаптических везикул, а также трехкратное увеличение экспрессии синаптофизина.

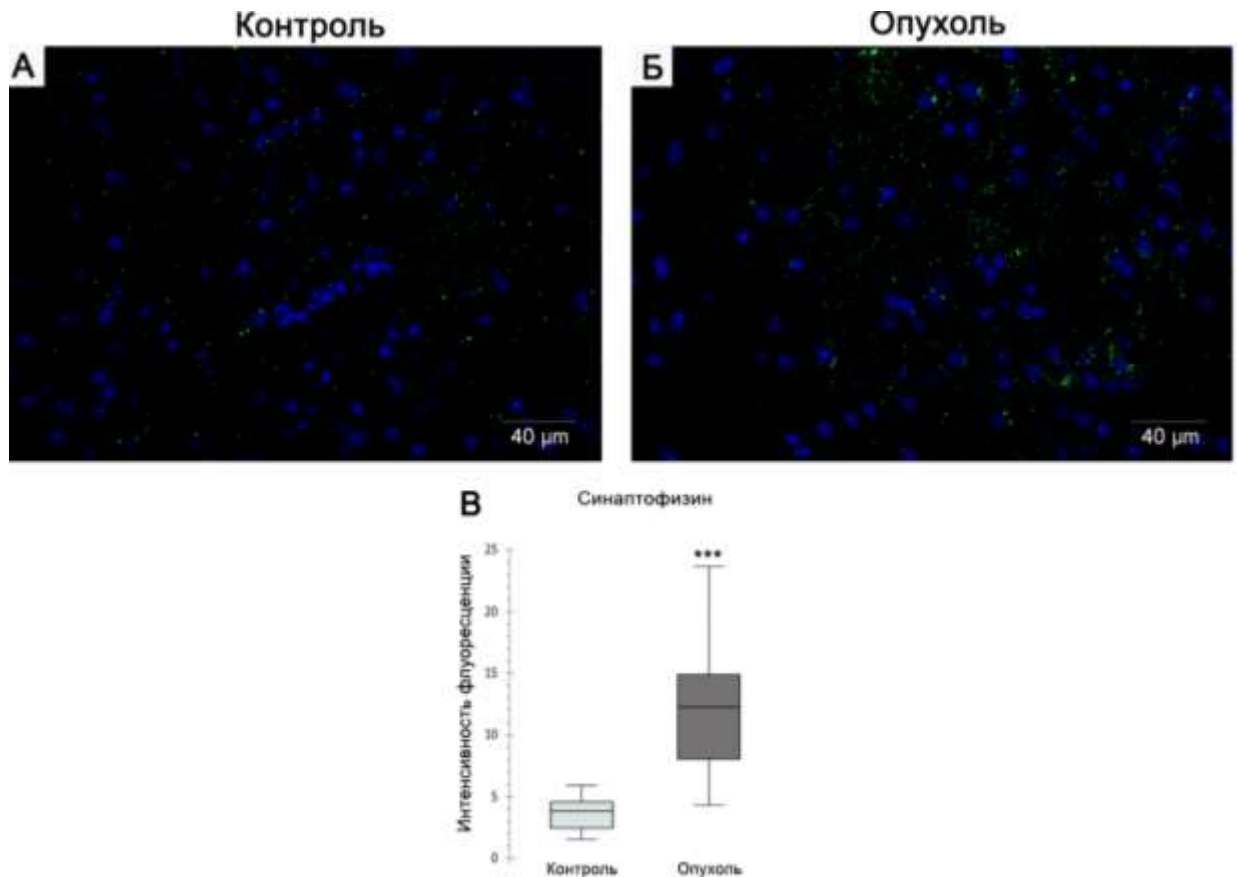


Рисунок 6. Экспрессия синаптического маркера синаптофизина в префронтальной коре intactных животных (Контроль) (А) и животных с опухолью (Опухоль) (Б). В – интенсивность флуоресценции. Ме (Q1;Q3). *** $p<0,0005$.

3.2 Структурная организация гематоэнцефалического барьера префронтальной коры при меланоме кожи

К компонентам гематоэнцефалического барьера относят эндотелиальные клетки, перициты, базальную мембрану и перикапиллярные ножки астроцитов.

При анализе ультраструктурной организации кровеносных капилляров префронтальной коры в группе Опухоль часто наблюдали сужение просвета сосудов, наличие длинных цитоплазматических отростков, выступающих в просвет сосуда. Отмечали набухание эндотелиоцитов, сопровождающееся просветлением цитоплазмы и снижением электронной плотности, наличие тромбоцитов в просвете сосудов. Кроме того, отмечали фрагментарное набухание базальной мембраны, локальное утолщение в 2-3 раза по сравнению с контролем, разрыхление с нарушением четкости контуров. Выраженный

перикапиллярный отек проявлялся расширением внеклеточного пространства вокруг капилляров, в котором визуализировался аморфный материал умеренной электронной плотности.

Перикапиллярные ножки астроцитов являются неотъемлемой частью гематоэнцефалического барьера. Для оценки проницаемости ГЭБ было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание на белок водного канала AQP4, экспрессирующийся на клеточной мембране астроцитов, а также на маркер астроцитов GFAP. В группе Опухоль достоверных различий в экспрессии глиального фибриллярного кислого белка GFAP не наблюдали, что говорит о соизмеримом количестве астроцитов во всех исследуемых группах (рис. 7, А-В). На препаратах префронтальной коры животных группы Опухоль отмечали значительное увеличение AQP4⁺-астроцитов на 56,5% ($p < 0.0001$) (рис. 7, Г-Е).

Базальная мембрана располагается между эндотелиальными клетками и перикапиллярными отростками астроцитов. В настоящем исследовании проводили оценку толщины базальной мембраны. У животных с опухолевым ростом значение данного параметра статистически не изменялось (рис. 8, Д).

При оценке типов контактов между эндотелиоцитами во всех группах отмечали наличие контактов типа наложение, конец в конец и интердигитации. В группе Контроль преобладали контакты типа наложение (59,1%). В группе Опухоль их содержание составило 50%, а также до 37,5% возросло число контактов типа конец в конец (рис. 8, А-Г).

С помощью морфометрического анализа в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров оценивали содержание люминальных и базальных кавеол, свободных транспортных везикул, клатриновых везикул, митохондрий, мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, полисом. Ни в одной из исследуемых групп животных не наблюдали достоверных различий в объемной плотности люминальных и базальных кавеол (табл. 2). Однако в группе Опухоль отмечали повышенное содержание свободных транспортных везикул ($p = 0,0076$) (рис. 9).

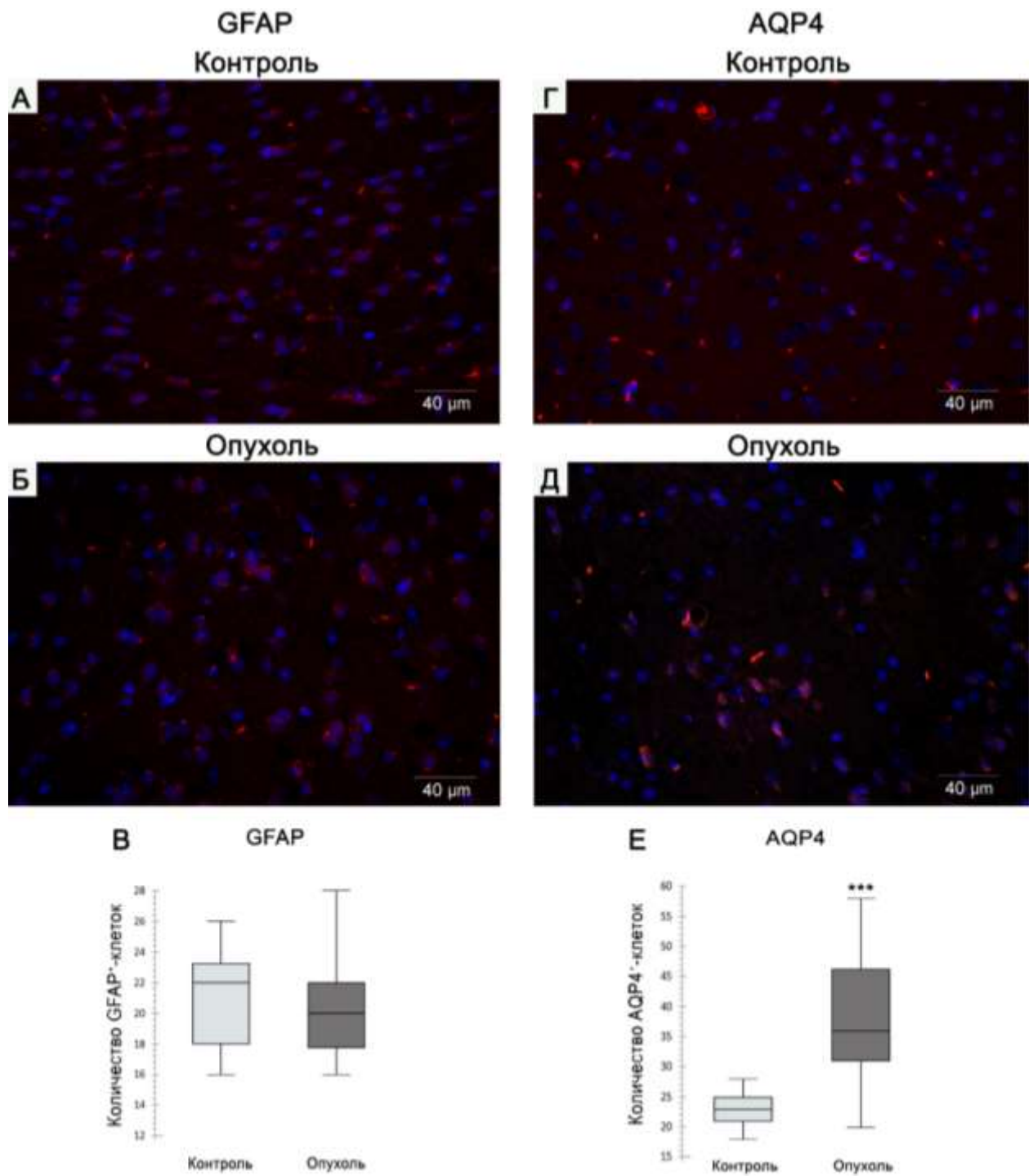


Рисунок 7. Экспрессия маркера астроцитов GFAP (А-В) и белка водного канала AQP4 (Г-Е) в префронтальной коре intactных животных (Контроль) и животных с опухолью (Опухоль). Количество GFAP⁺- (В) и AQP4⁺-астроцитов (Е). Ме (Q1;Q3). *** $p < 0,0005$ по сравнению с контрольной группой.

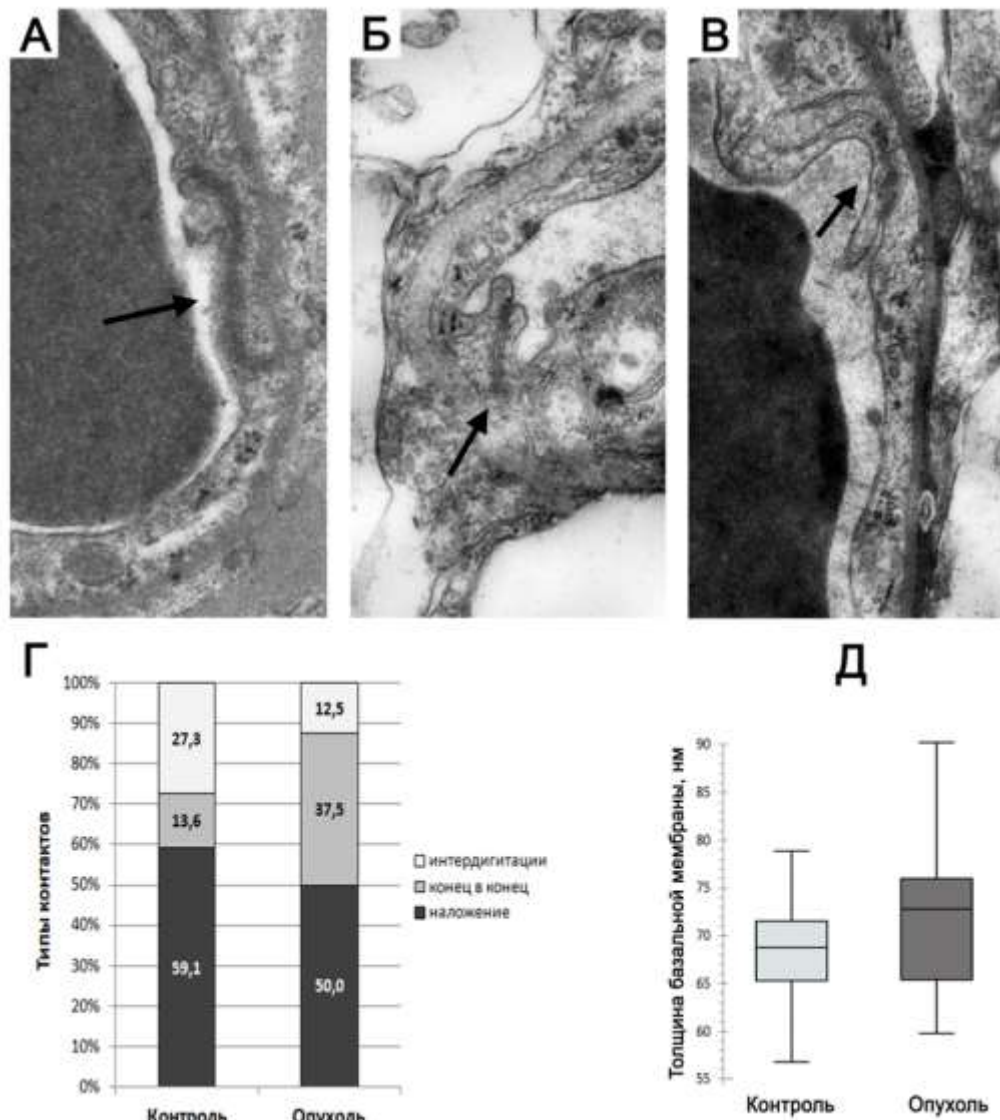


Рисунок 8. Типы контактов эндотелиоцитов ГЭБ при меланоме. Контакты типа наложение (А), конец в конец (Б) и интердигитации (В). Г – процентное соотношение типов контактов. Д – толщина базальной мембраны, нм. Ме (Q1;Q3).

Таблица 2. Результаты морфометрического анализа эндотелиоцитов кровеносных капилляров префронтальной коры при меланоме, Ме (Q1; Q3).

Параметры (V _v , %)	Группа	
	Контроль	Опухоль
Люминальные кавеолы	0,79 (0,27; 1,84)	0,62 (0,52; 1,19)
Базальные кавеолы	1,10 (0,58; 2,31)	1,12 (0,84; 2,17)
Транспортные везикулы	5,69 (3,32; 7,68)	8,94 (7,42; 10,76) *
Клатриновые везикулы	0,00	0,00
Полисомы	12,14 (7,55; 16,60)	7,23 (3,29; 11,58) *
Митохондрии	4,62 (0; 7,97)	2,12 (0; 6,52)
ЭПР	0 (0; 1,82)	0 (0; 1,01)

Примечание: V_v – Объемная плотность (%) внутриклеточных органелл интактных животных (Контроль) и животных с опухолью (Опухоль). * p<0,05 по сравнению с контролем.

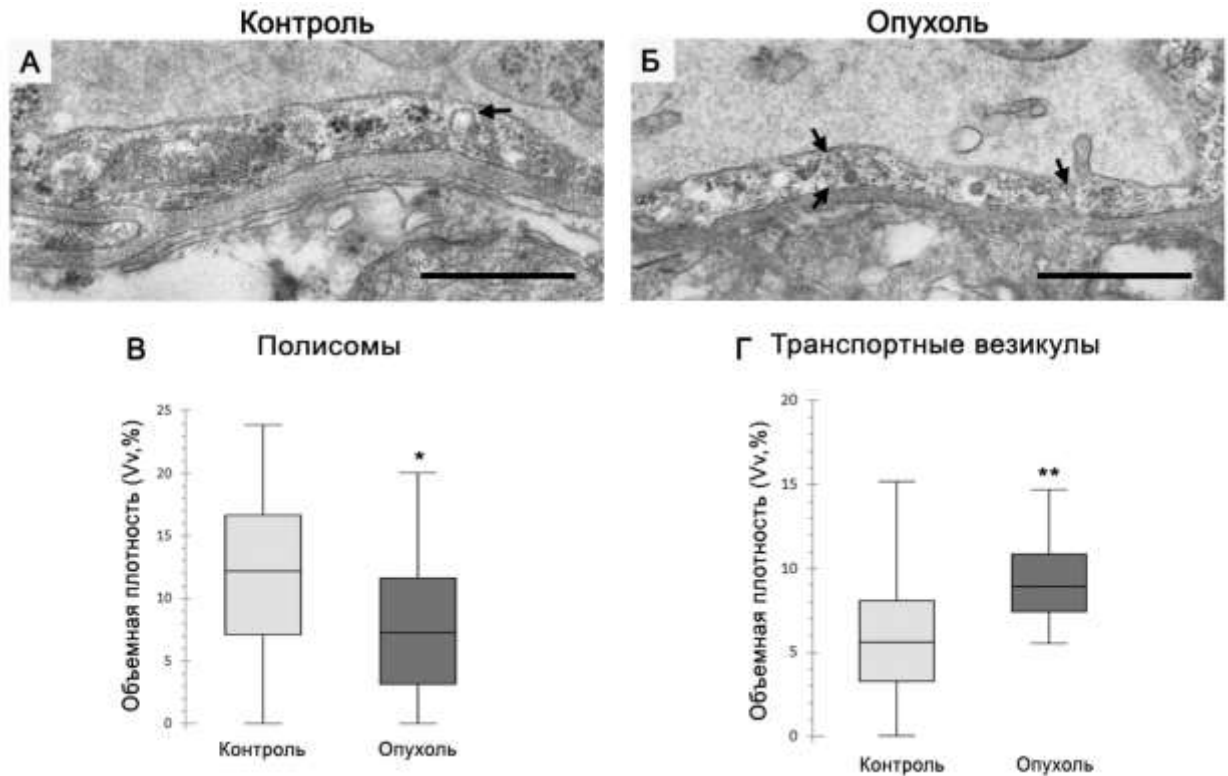


Рисунок 9. Структура эндотелиоцитов префронтальной коры intactных животных (Контроль) (А) и животных с опухолью (Опухоль) (Б). Линейка – 1 μ м. Транспортные везикулы отмечены стрелками. Объемная плотность полисом (В) и транспортных везикул (Г). Ме (Q1;Q3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ по сравнению с контролем.

Для оценки синтетической функции эндотелиоцитов префронтальной коры оценивали объемную плотность свободных полисом. В группе Опухоль наблюдали почти двукратное снижение содержания полисом. Морфометрический анализ митохондрий не выявил достоверных различий в объемной плотности данных органелл по сравнению с контролем (см. табл. 2).

Резюме

При анализе структур ГЭБ в группе Опухоль было выявлено достоверное увеличение экспрессии водного канала астроцитов AQP4, увеличение объемной плотности транспортных везикул и снижение объемной плотности полисом в эндотелиоцитах кровеносных капилляров.

3.3 Ультраструктурная перестройка пирамидных нейронов при применении карбоната лития

В группе Контроль + Li в цитоплазме пирамидных нейронов префронтальной коры наблюдали достоверное снижение объемной плотности митохондрий и ЭПР со структурными нарушениями ($p < 0,0001$) (рис. 10). В отличие от контрольной группы, где единичные митохондрии имели незначительные изменения крист, в группе Контроль + Li митохондрии с деструктивными изменениями отсутствовали полностью (табл. 3). Кроме того, отмечали значительное снижение неопушенных и опушенных клатрином везикул на 88,9% и 71,4% соответственно ($p < 0,0001$) (см. табл. 3). При анализе структуры синапсов в группе Контроль + Li отмечали увеличение количества синапсов на 21,2% ($p < 0,05$). В пресинаптических окончаниях синаптические везикулы были плотно упакованы, их распределение у активной зоны не отличалось от контроля. Достоверных различий в объемной плотности синаптических везикул не наблюдали.

В группе Опухоль + Li отмечали снижение объемной плотности митохондрий с деструктивными изменениями на 81,8% ($p < 0,0005$) и ЭПР с расширенными цистернами на 85,4% ($p < 0,0005$) в сравнении с группой Опухоль (рис. 10). Цистерны ЭПР в большинстве нейронов имели нормальный щелевидный просвет, мембраны ЭПР сохраняли целостность, их электронная плотность не отличалась от контроля. Объемная плотность полисом увеличилась на 37,0% ($p = 0,0083$) по сравнению с группой Опухоль и на 15,3% относительно группы контроля. Содержание транспортных везикул в группе Опухоль + Li достоверно снизилось на 79,2% ($p < 0,0001$) по сравнению с группой Опухоль (см. табл. 3).

В обеих группах с применением лития (Контроль + Li и Опухоль + Li) отмечали преобладание лизосом, сравнимое с интактными животными. В обеих группах с применением карбоната лития наблюдали уровень экспрессии LC3 β сопоставимый с группой контроля (рис. 11). Кроме того, в обеих группах отмечали увеличение интенсивности флуоресценции синаптофизина относительно группы контроля ($p < 0,005$) (рис. 12).

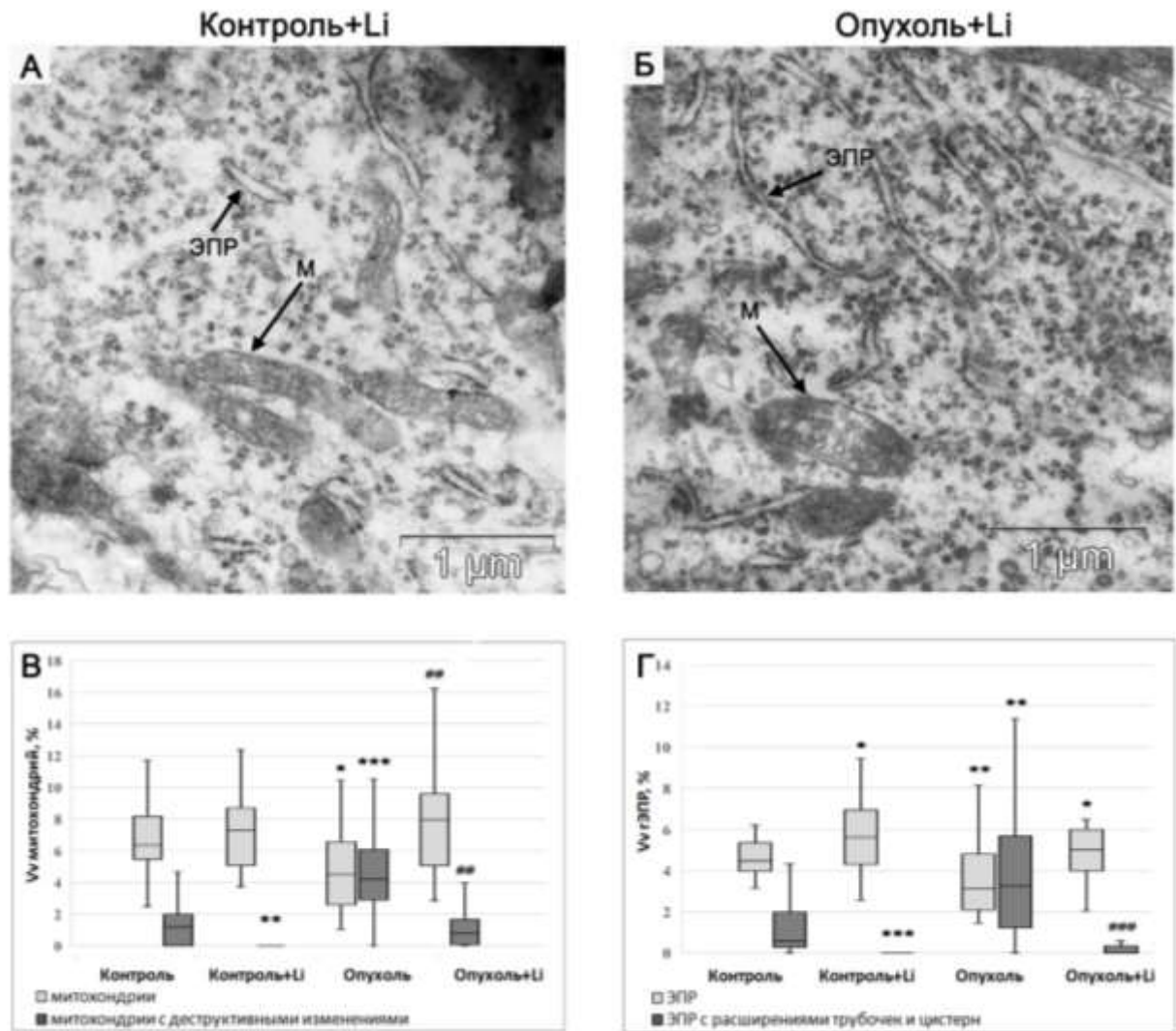


Рисунок 10. Ультраструктура эндоплазматической сети (ЭПР) и митохондрий (М) пирамидных нейронов префронтальной коры контрольных животных, принимавших карбонат лития (Контроль + Li) (А) и животных с опухолью, принимавших карбонат лития (Опухоль + Li) (Б). ТЕМ. Объемная плотность митохондрий (В) и ЭПР (Г). Ме(Q1;Q3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем. ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

Таблица 3. Морфометрический анализ нейронов префронтальной коры при применении карбоната лития в условиях меланомы, Ме (Q1; Q3).

Параметры (Vv, %)	Группа			
	Контроль	Контроль + Li	Опухоль	Опухоль + Li
Митохондрии	6,36 (5,47; 8,19)	7,30 (5,08; 8,70)	4,53 (2,58; 6,56)*	8,90 (5,73; 9,65)##
Митохондрии с деструктивными изменениями	1,20 (0,00; 1,98)	0***	4,19 (2,90; 6,08)***	0,93 (0,36; 2,00)##
ЭПР	4,47 (3,99; 5,36)	5,63 (4,30; 6,96)*	3,15 (2,11; 4,80)*	4,10 (3,71; 5,77)
ЭПР с расширен- ными цистернами	0,57 (0,27; 1,99)	0***	3,25 (1,22; 5,70)**	0,00 (0,00; 0,37)*,###

Продолжение табл. 3.

Параметры (V_v , %)	Контроль	Контроль + Li	Опухоль	Опухоль + Li
Полисомы	29,56 (22,50; 33,79)	27,15 (24,20; 29,64)	24,88 (19,28; 32,58)	34,08 (32,55; 39,31)*, ##
Транспортные везикулы	0,63 (0,33; 0,82)	0,07 (0,04; 0,13)***	0,53 (0,30; 0,70)	0,11 (0,09; 0,18)***, ###
Клатриновые везикулы	0,21 (0,16; 0,39)	0,06 (0,04; 0,15)***	0,24 (0,14; 0,31)	0,16 (0,09; 0,32)
Липофусциновые тельца	0,15 (0; 0,54)	0 (0; 0,64)	0,28 (0; 0,57)	0 (0; 0,47)

Примечание: V_v – объемная плотность (%) внутриклеточных органелл интактных животных (Контроль); контрольных животных, получавших карбонат лития (Контроль + Li); животных с опухолью (Опухоль); животных с опухолью, получавших карбонат лития (Опухоль + Li). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем. ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

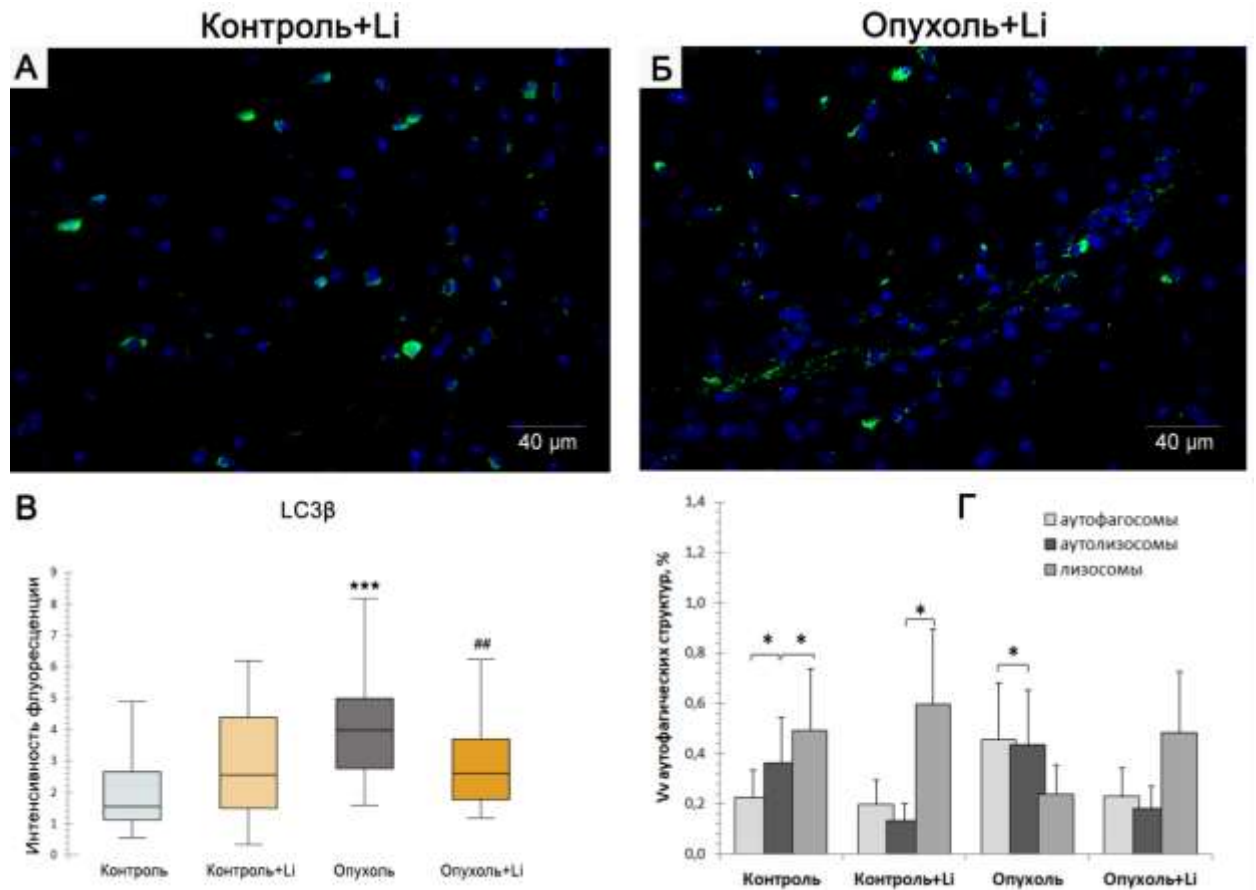


Рисунок 11. Структурные признаки аутофагии в префронтальной коре при применении карбоната лития в условиях меланомы. Экспрессия LC3β в префронтальной коре контрольных животных, получавших карбонат лития (Контроль + Li) (А) и животных с опухолью, получавших карбонат лития (Опухоль + Li) (Б). В – интенсивность флуоресценции. Г – объемная плотность аутофагических структур пирамидных нейронов префронтальной коры. Ме (Q1;Q3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем. ## $p < 0,005$ по сравнению с группой Опухоль.

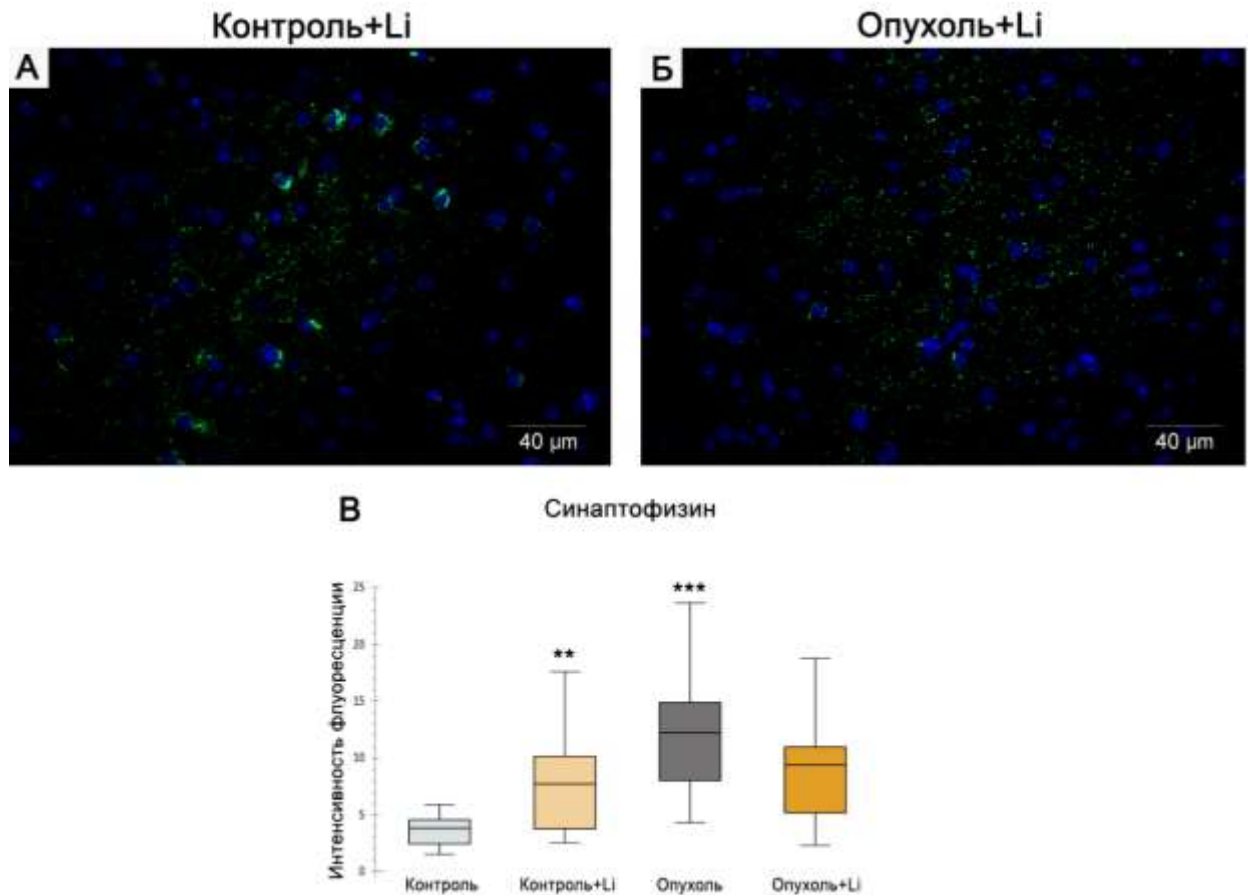


Рисунок 12. Экспрессия синаптофизина в префронтальной коре при применении карбоната лития в контроле (Контроль + Li) (А) и в модели меланомы кожи (Опухоль + Li) (Б). В – интенсивность флуоресценции. Ме (Q1;Q3). ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем.

Резюме

В пирамидных нейронах префронтальной коры при применении лития как в условиях моделирования меланомы кожи, так и в контроле выявлено значительное снижение объемной плотности митохондрий с деструкцией крист и ЭПР с расширением цистерн, снижение объемной плотности транспортных везикул. Также в группах Контроль + Li и Опухоль + Li наблюдали преобладание лизосом в цитоплазме пирамидных нейронов, как и в группе контроля, а уровень экспрессии LC3β был ниже, чем в группе Опухоль и сопоставим с контролем.

В группах с применением лития изменений в объемной плотности синаптических везикул в синапсах префронтальной коры обнаружено не было, однако наблюдали увеличение экспрессии синаптофизина в сравнении с контролем.

3.4 Влияние карбоната лития на гематоэнцефалический барьер

В группе Контроль + Li анализ экспрессии маркера астроцитов GFAP и водного канала AQP4 не показал достоверных различий по сравнению с контрольной группой (рис.13). Отмечали снижение толщины базальной мембраны в группе Контроль + Li по сравнению с контрольной группой. Достоверных различий в объемной плотности люминальных и базальных кавеол в эндотелиоцитах кровеносных капилляров префронтальной коры выявлено не было. Морфологически кавеолы в группе Контроль + Li не отличались от контроля: они имели характерную колбообразную форму, диаметр 50-70 нм, располагались как на люминальной, так и на базальной поверхности эндотелиоцитов. Объемная плотность транспортных везикул не отличалась от соответствующей величины в контроле (рис. 14).

В группе Опухоль + Li количество AQP4-позитивных клеток снижалось относительно группы Опухоль и достигало уровня контрольной группы (см. рис. 13). Наблюдали достоверное увеличение толщины базальной мембраны. Базальная мембрана имела равномерную толщину, четкие контуры, без признаков разрыхления или фрагментации, характерных для группы Опухоль. Не обнаружили достоверных различий в объемной плотности люминальных и базальных кавеол в эндотелиоцитах. Однако наблюдали восстановление транспортных везикул до уровня контроля (см. рис. 14). Кроме того, отмечали увеличение объемной плотности полисом в сравнении с группой Опухоль, что было сопоставимо с контрольными значениями.

Резюме

В группе Контроль + Li ультраструктурная организация эндотелиоцитов не отличалась от контроля. В группе Опухоль + Li применение карбоната лития способствовало нормализации показателей гематоэнцефалического барьера, что проявлялось в снижении количества AQP4-позитивных клеток до уровня контроля. В эндотелиоцитах отмечали увеличение объемной плотности полисом и снижение транспортных везикул до контрольных значений.

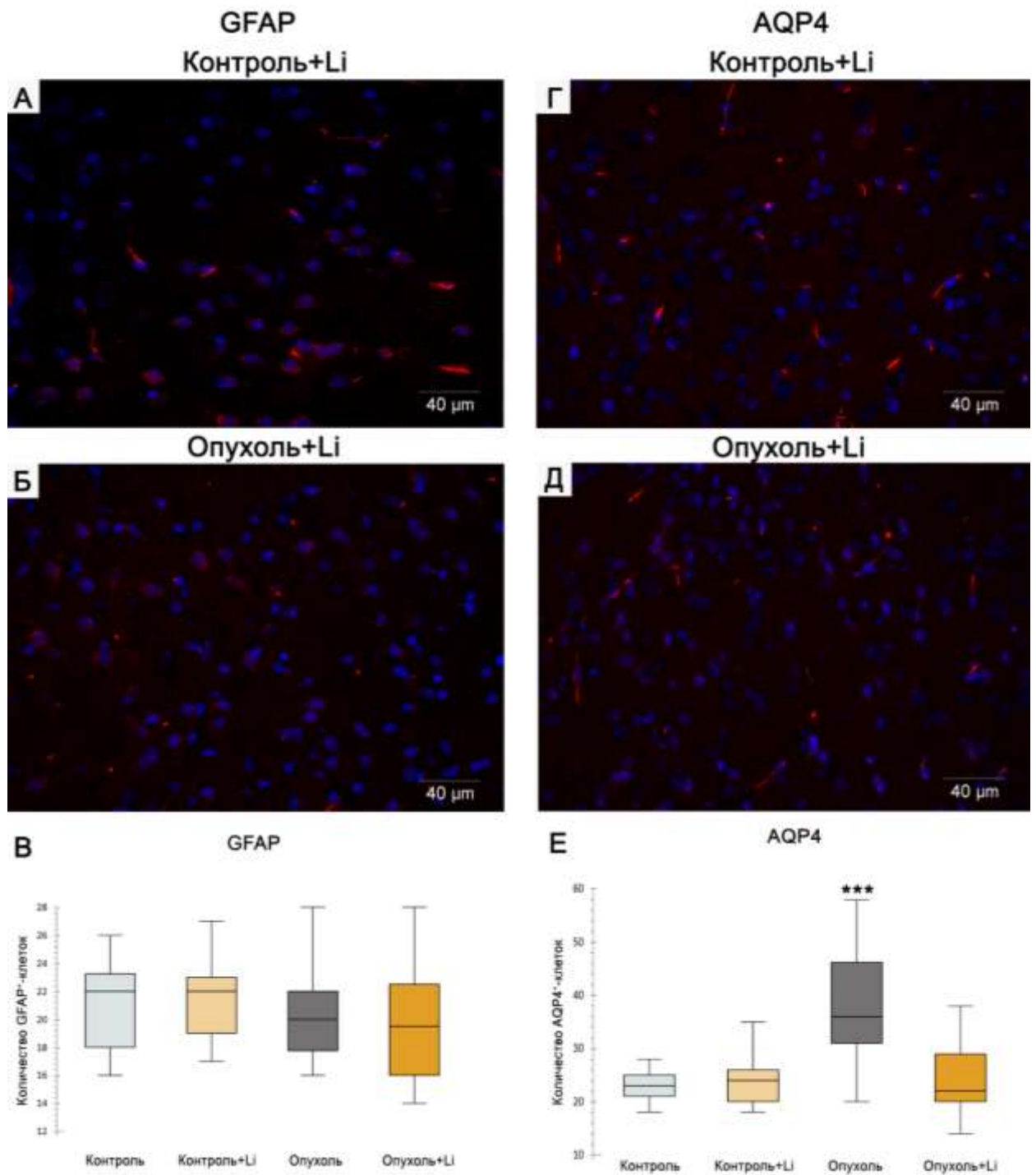


Рисунок 13. Экспрессия маркера астроцитов GFAP (А-В) и белка водного канала AQP4 (Г-Е) в префронтальной коре при применении карбоната лития в контроле (Контроль + Li) и в группе Опухоль (Опухоль + Li). Количество GFAP⁺- (В) и AQP4⁺-астроцитов (Е). Ме (Q1;Q3). ***p<0,0005 по сравнению с контрольной группой.

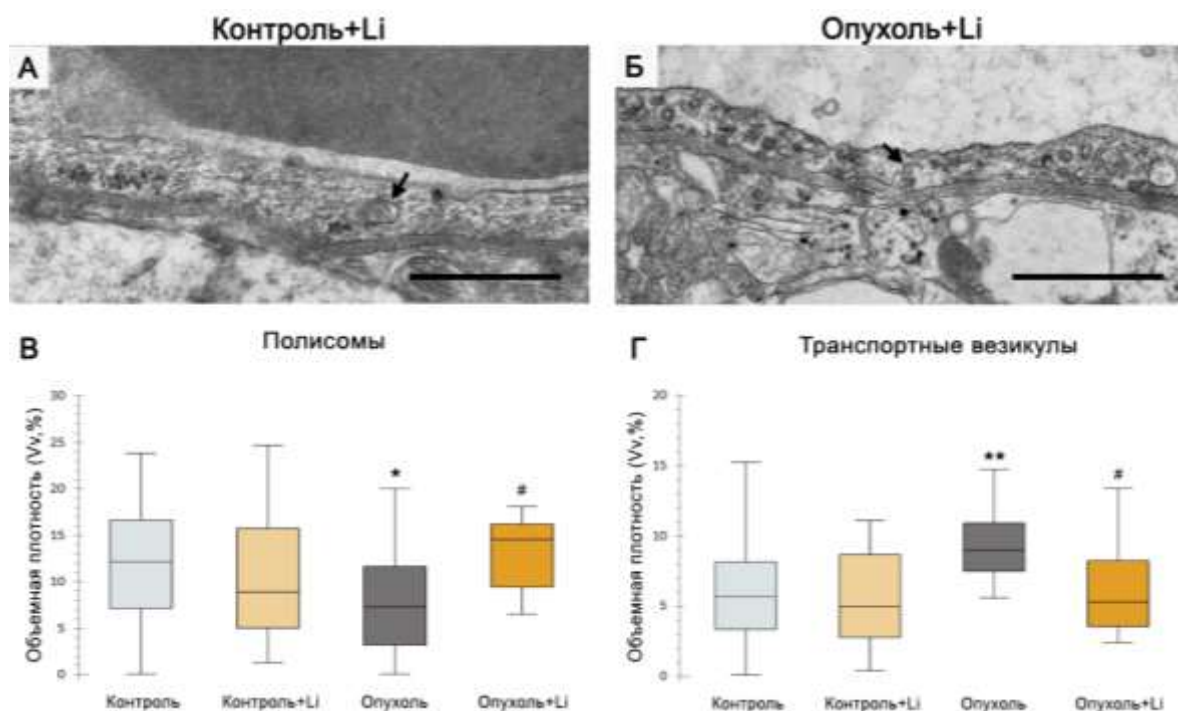


Рисунок 14. Структура эндотелиоцитов префронтальной коры при применении карбоната лития в модели меланомы. А – контрольные животные, принимавшие карбонат лития (Контроль + Li), Б – животные с опухолью, принимавшие карбонат лития (Опухоль + Li). Транспортные везикулы отмечены стрелками. Линейка – 1 μm. Объемная плотность полисом (В) и транспортных везикул (Г). Ме (Q1;Q3). * $p<0,05$; ** $p<0,005$ по сравнению с контролем. # $p<0,05$ по сравнению с группой Опухоль.

3.5 Влияние хлорохина на ультраструктуру пирамидных нейронов

В группе Контроль + CQ отмечали увеличение объемной плотности морфологически неповрежденных митохондрий, а также снижение объемной плотности митохондрий с деструктивными изменениями ($p<0,05$) (рис. 15). Кроме того, наблюдали снижение объемной плотности полисом ($p<0,0001$). Распределение полисом в цитоплазме было равномерным. Отмечали снижение объемной плотности свободных транспортных везикул на 47,6% ($p<0,0001$), клатриновых везикул на 33,3% ($p<0,001$) (табл. 4).

В группе Опухоль + CQ наблюдали двукратное увеличение объемной плотности ЭПР ($p<0,0005$), а также значительное снижение объемной плотности ЭПР с расширением цистерн ($p<0,0001$) в сравнении с группой Опухоль. Отмечали снижение транспортных везикул на 58,3% и достоверное пятикратное повышение содержания липофусциновых телец (см. табл. 4). Липофусциновые тельца в группе Опухоль + CQ имели крупные размеры (диаметр от 0,8

до 2,0 мкм), неправильную округлую форму и характеризовались гетерогенным содержимым высокой электронной плотности, а также наличием на периферии липидных включений (см. рис. 15).

В группе Опухоль + CQ объемная плотность митохондрий с деструктивными изменениями составила 4,16%, что было сопоставимо с группой Опухоль (4,19%) и достоверно выше контроля ($p < 0,0005$) (см. табл. 4). Митохондрии с морфологическими признаками деструкции крист (фрагментация, редукция, просветление матрикса) встречались так же часто, как и в группе Опухоль. Хлорохин не оказал протективного эффекта на митохондрии в условиях опухолевого роста.

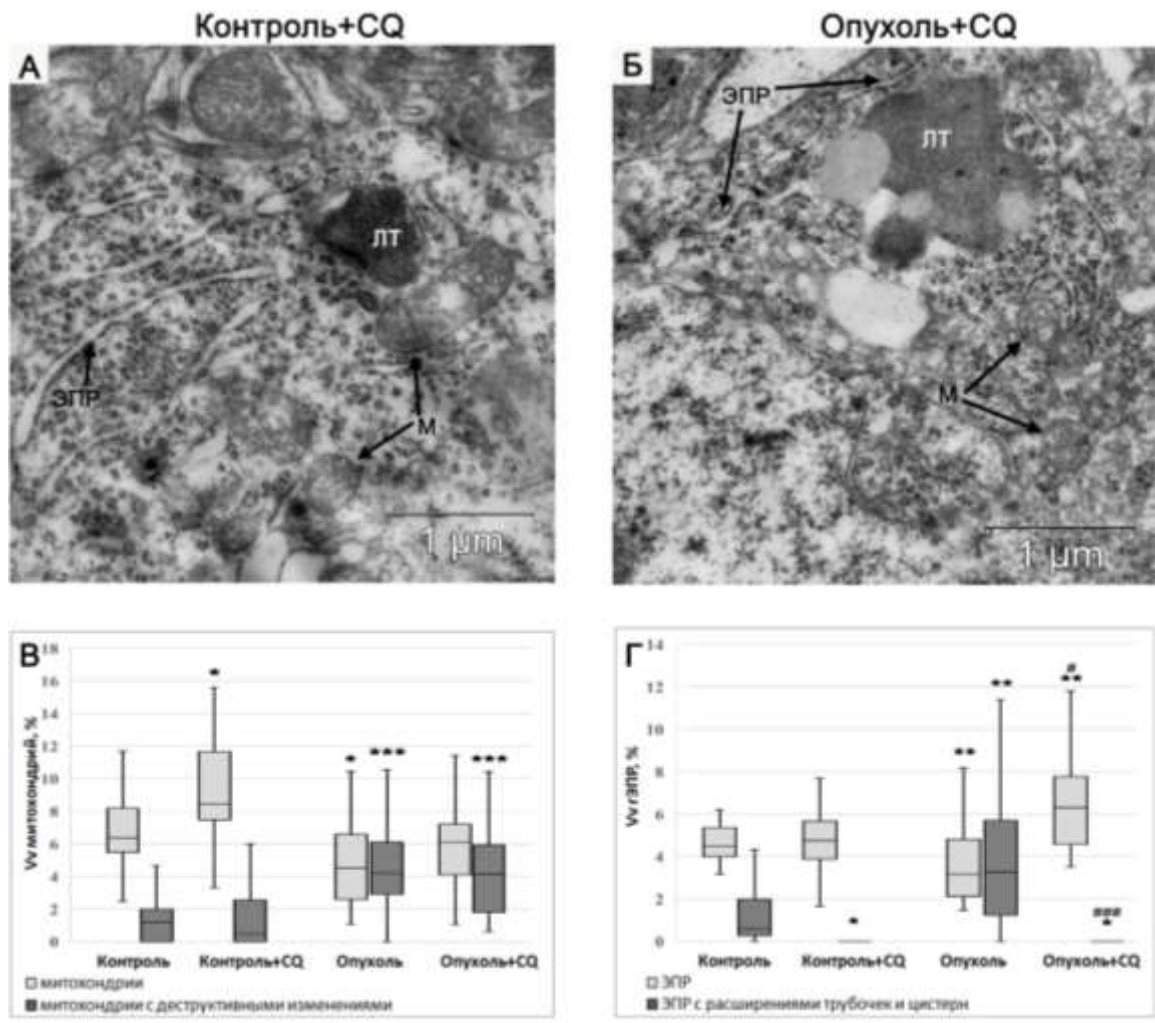


Рисунок 15. Эндоплазматическая сеть (ЭПР), митохондрии (М) и липофусциновые тельца (ЛТ) пирамидных нейронов префронтальной коры контрольных животных, принимавших хлорохин (Контроль + CQ) (А) и животных с опухолью, принимавших хлорохин (Опухоль + CQ) (Б). Объемная плотность митохондрий (В) и ЭПР (Г). Ме (Q1;Q3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

Таблица 4. Морфометрический анализ нейронов префронтальной коры при применении хлорохина. Me (Q1; Q3).

Параметры	Группа			
	Контроль	Контроль + CQ	Опухоль	Опухоль + CQ
Митохондрии	6,36 (5,47; 8,19)	8,44 (7,47; 11,64)*	4,53 (2,58; 6,56)*	6,08 (4,09; 7,20)
Митохондрии с деструктивными изменениями	1,20 (0,00; 1,98)	0,50 (0; 2,54)*	4,19 (2,90; 6,08)***	4,16 (1,80; 5,92)***
ЭПР	4,47 (3,99; 5,36)	4,73 (3,87; 5,66)	3,15 (2,11; 4,80)*	6,31 (4,56; 7,75)**, ###
ЭПР с расширенными цистернами	0,57 (0,27; 1,99)	0*	3,25 (1,22; 5,70)**	0***, ###
Полисомы	29,56 (22,50; 33,79)	21,8 (19,61; 25,08)***	24,88 (19,28; 32,58)	30,0 (28,21; 32,23)#
Транспортные везикулы	0,63 (0,33; 0,82)	0,33 (0,23; 0,44)***	0,53 (0,30; 0,70)	0,21 (0,09; 0,30)***, ###
Клатриновые везикулы	0,21 (0,16; 0,39)	0,14 (0,10; 0,21)**	0,24 (0,14; 0,31)	0,10 (0,05; 0,16)***, ##
Липофусциновые тельца	0,15 (0; 0,54)	0,39 (0; 1,03)	0,28 (0; 0,57)	1,46 (0; 2,61)**, #

Примечание: V_v – объемная плотность (%) внутриклеточных органелл интактных животных (Контроль); контрольных животных, получавших хлорохин (Контроль + CQ); животных с опухолью (Опухоль); животных с опухолью, получавших хлорохин (Опухоль + CQ). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

В группе Опухоль + CQ наблюдали накопление аутофагосом и лизосом и снижение аутолизосом. В отличие от группы Опухоль, где на аутолизосомы приходилось 38,6% от общего числа аутофагических структур, в группе Опухоль + CQ аутолизосомы встречались редко (7,6%), что могло быть следствием нарушения процесса слияния аутофагосом с лизосомами.

Во всех группах с применением хлорохина при иммунофлуоресцентном анализе префронтальной коры отмечали значительное повышение экспрессии LC3 β в сравнении с группой контроля (рис. 16).

При анализе синапсов нейронов префронтальной коры было отмечено, что хлорохин как в группе Контроль + CQ, так и Опухоль + CQ способствовал повышению объемной плотности синаптических везикул. В группе Опухоль + CQ наблюдали значительное увеличение количества синапсов в фрагментах префронтальной коры.

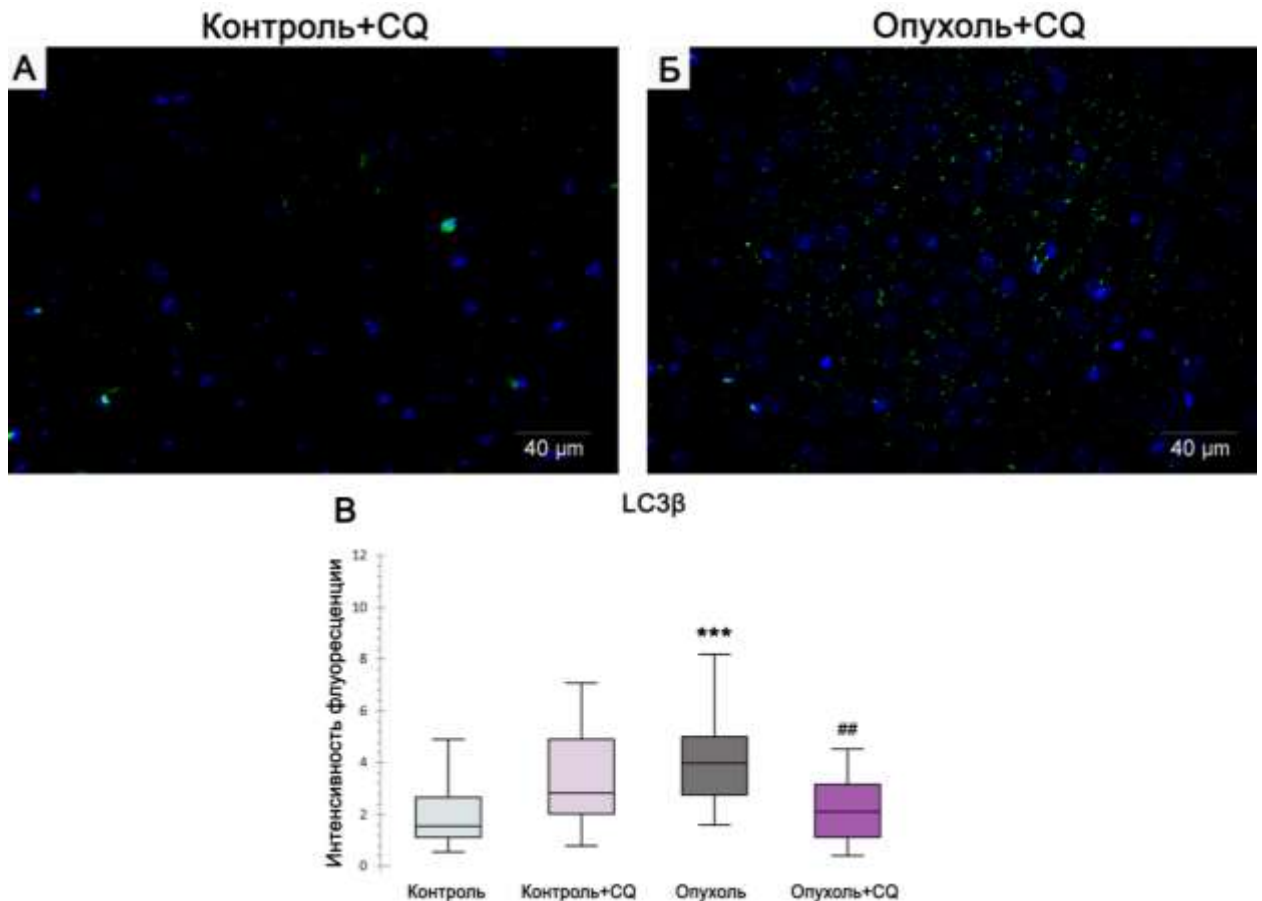


Рисунок 16. Экспрессия маркера аутофагосом LC3β в компонентах префронтальной коры контрольных животных, принимавших хлорохин (Контроль + CQ) (А) и животных с опухолью, принимавших хлорохин (Опухоль + CQ) (Б). В – интенсивность флуоресценции. Me (Q1;Q3). *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; ## $p < 0,005$ по сравнению с группой Опухоль.

Интересно, что в группе Контроль + CQ отмечали увеличение интенсивности флуоресценции синаптофизина ($p < 0,005$), а в группе Опухоль + CQ медианное значение приближалось к значениям контрольной группы (рис. 17).

Резюме

В группе Контроль + CQ в пирамидных нейронах префронтальной коры наблюдали достоверное снижение объемной плотности гЭПР с расширениями цистерн, а также снижение транспортных и клатриновых везикул. При анализе синапсов выявили повышение объемной плотности синаптических везикул и повышение экспрессии синаптофизина.

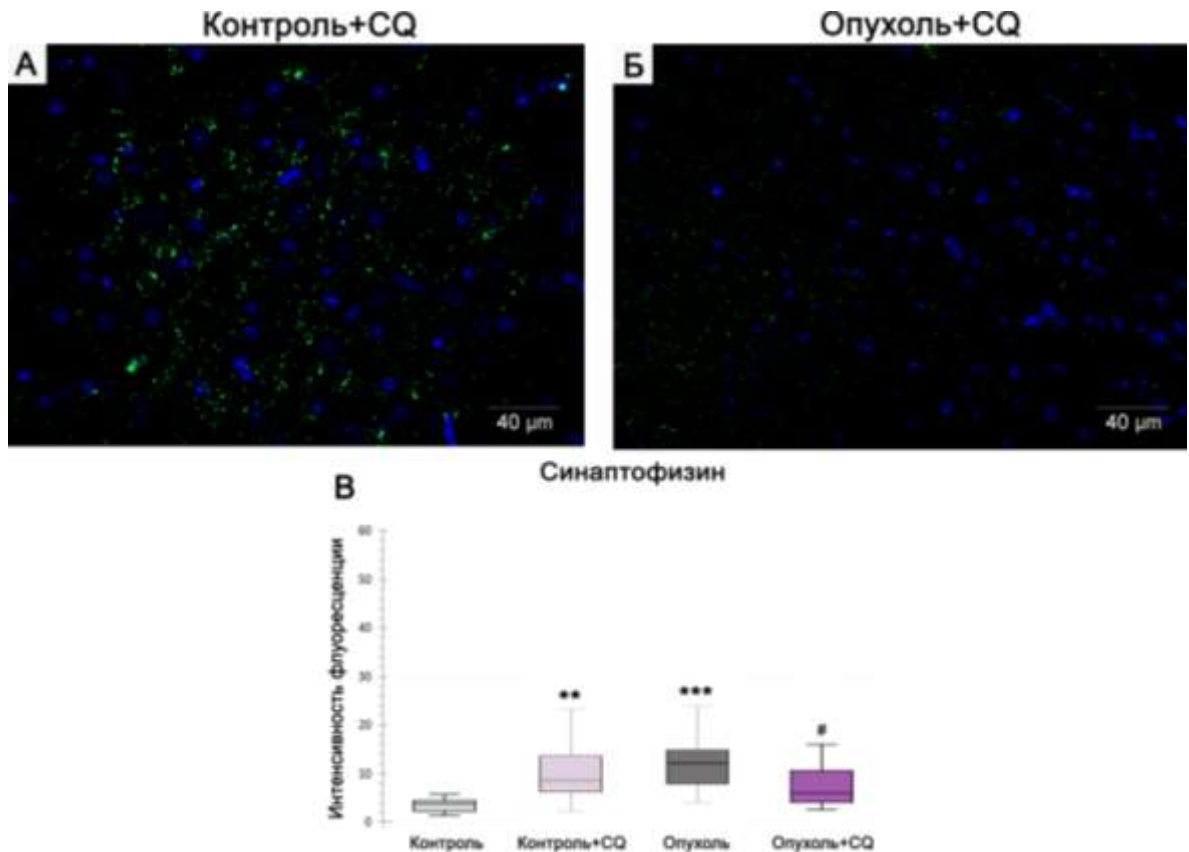


Рисунок 17. Экспрессия синаптического маркера синаптофизина в префронтальной коре контрольных животных, принимавших хлорохин (Контроль + CQ) (А) и животных с опухолью, принимавших хлорохин (Опухоль + CQ) (Б). В – интенсивность флуоресценции. Ме (Q1;Q3). ** $p<0,005$; *** $p<0,0005$ по сравнению с контрольной группой; # $p<0,05$ по сравнению с группой Опухоль.

В группе Опухоль + CQ объемная плотность митохондрий с деструктивными изменениями была соизмерима с группой Опухоль. Отмечали достоверное снижение объемной плотности гЭПР с расширениями цистерн, снижение транспортных везикул. Наблюдали накопление аутофагосом и лизосом и снижение аутолизосом. Выявили достоверное увеличение количества синапсов и повышение объемной плотности синаптических везикул, при этом значение экспрессии синаптофизина снижалось относительно группы Опухоль.

3.6 Структура компонентов гематоэнцефалического барьера при применении хлорохина

В группе Контроль + CQ в компонентах префронтальной коры достоверных различий в экспрессии глиального фибриллярного кислого белка GFAP и водного канала AQP4 не наблюдали (рис. 18). При определении толщины

базальной мембраны обнаружено достоверное ее снижение. С помощью морфометрического анализа в эндотелиоцитах ГЭБ наблюдали достоверное снижение объемной плотности транспортных везикул ($p < 0,05$) (табл. 5). Достоверных различий в объемной плотности базальных и люминальных кавеол и митохондрий между исследуемыми группами не наблюдали.

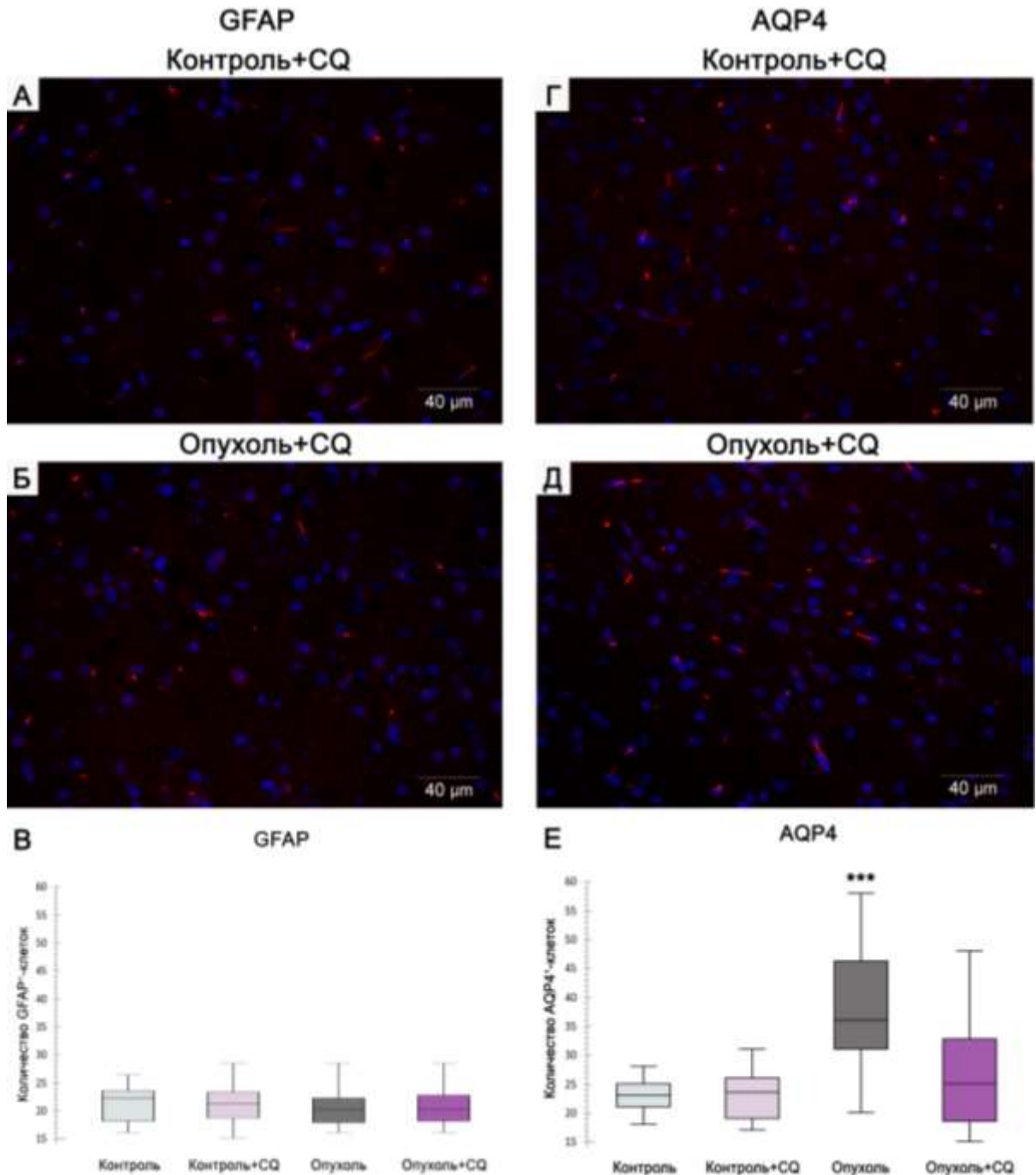


Рисунок 18. Экспрессия GFAP (А-В) и AQP4 (Г-Е) в префронтальной коре контрольных животных, принимавших хлорохин (Контроль + CQ) (А, Г) и животных с опухолью, принимавших хлорохин (Опухоль + CQ) (Б, Д). Количество GFAP⁺- (В) и AQP4⁺-астроцитов (Е). Ме (Q1;Q3). *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем.

Таблица 5. Результаты морфометрического анализа эндотелиоцитов кровеносных капилляров префронтальной коры при применении хлорохина в условиях меланомы. Me (Q1; Q3).

Параметры, Vv	Группа			
	Контроль	Контроль + CQ	Опухоль	Опухоль + CQ
Люминальные кавеолы	0,79 (0,27; 1,84)	1,41 (0,64; 2,24)	0,62 (0,52; 1,19)	0,79 (0,13; 1,28)
Базальные кавеолы	1,10 (0,58; 2,31)	0,95 (0,31; 1,90)	1,12 (0,84; 2,17)	0,75 (0; 1,73)
Транспортные везикулы	5,69 (3,32; 7,68)	2,20 (1,39; 4,31)*	8,94 (7,42; 10,76)*	6,12 (4,31; 7,46)#
Клатриновые везикулы	0	0 (0; 0,75)	0	0 (0; 0,13)
Полисомы	12,14 (7,55; 16,60)	7,99 (5,16; 14,39)	7,23 (3,29; 11,58)*	17,85 (14,89; 20,62)#
Митохондрии	4,62 (0; 7,97)	0 (0; 10,03)	2,12 (0; 6,52)	0 (0; 5,86)
ЭПР	0 (0; 1,82)	1,90 (0,63; 2,78)*	0 (0; 1,01)	0 (0; 1,69)

Примечание: Vv – Объемная плотность (%) внутриклеточных органелл контрольных животных, принимавших хлорохин (Контроль + CQ) и животных с опухолью, принимавших хлорохин (Опухоль + CQ). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой Опухоль.

В группе Опухоль + CQ наблюдали снижение количества AQP4-позитивных клеток до уровня контрольной группы (см. рис. 18). Отмечали достоверное снижение толщины базальной мембраны. При морфометрическом анализе эндотелиоцитов кровеносных капилляров префронтальной коры выявили достоверное снижение объемной плотности транспортных везикул до уровня контроля ($p < 0,05$) и значительное повышение полисом ($p < 0,05$) (см. табл. 5). Показатели объемной плотности базальных и люминальных кавеол, ЭПР и митохондрий сопоставимы с контролем.

Резюме

В группе Контроль + CQ при оценке структуры гематоэнцефалического барьера префронтальной коры достоверных различий в экспрессии водного канала астроцитов AQP4 в сравнении с группой контроля выявлено не

было. В эндотелиоцитах кровеносных капилляров наблюдали достоверное снижение объемной плотности транспортных везикул по сравнению с контрольной группой.

В группе Опухоль + CQ также достоверных различий в экспрессии AQP4 по сравнению с группой контроля не выявлено. В эндотелиоцитах отмечали достоверное снижение объемной плотности транспортных везикул по сравнению с группой Опухоль и значительное повышение объемной плотности полисом.

3.7 Анализ экспрессии фактора гипоксии и нейротрофического фактора мозга в префронтальной коре при моделировании меланомы кожи

Маркер гипоксии HIF1 α может локализоваться как в цитоплазме, так и в ядре. У животных в группе интактного контроля наблюдали окрашивание цитоплазмы отдельных нейронов и эндотелиоцитов. В группе Опухоль отмечали увеличение площади окрашивания HIF1 α как в цитоплазме, так и в ядрах ($p < 0,05$) (рис. 19, А-В).

Иммуногистохимический анализ экспрессии маркера нейротрофического фактора головного мозга BDNF в срезах префронтальной коры показал, что в опухолевой группе площадь BDNF⁺-областей уменьшилась на 64,5% ($p < 0,00001$) (см. рис. 19, Г-Е).

Резюме

В группе Опухоль в компонентах префронтальной коры отмечали локализацию фактора гипоксии HIF1 α как в цитоплазме, так и в ядрах нейронов и повышение его экспрессии, а также многократное снижение нейротрофического фактора BDNF.

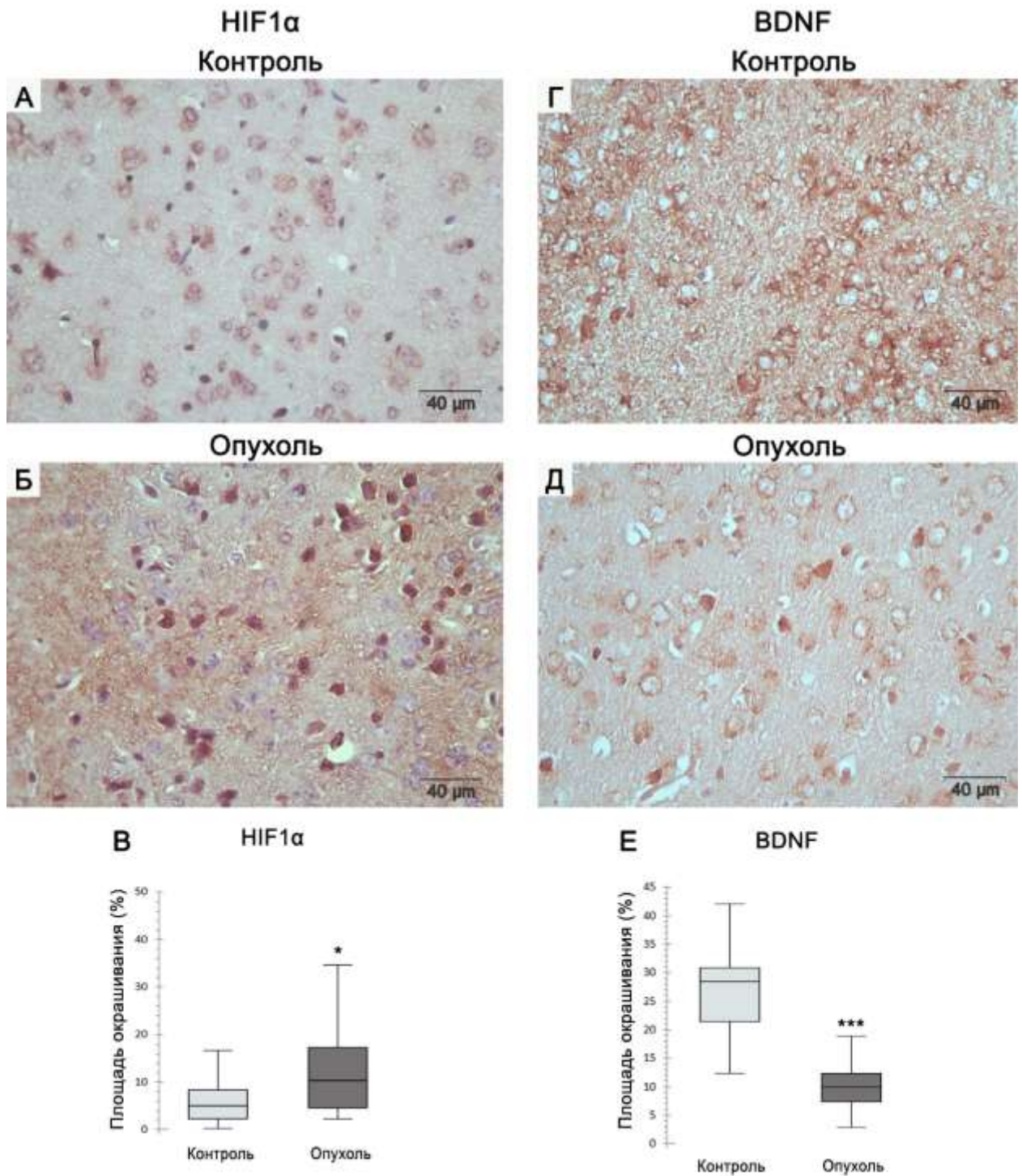


Рисунок 19. Экспрессия маркера гипоксии HIF1α (А-В) и нейротрофического фактора головного мозга BDNF (Г-Е) в префронтальной коре intactных животных (Контроль) (А, Г) и животных с опухолью (Опухоль) (Б, Д). Площадь окрашивания (%) HIF1α (В) и BDNF (Е). Ме (Q1;Q3). * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ по сравнению с контрольной группой.

3.8 Фактор гипоксии HIF1 α и нейротрофический фактор BDNF в префронтальной коре при применении карбоната лития

В группе Контроль + Li при иммуногистохимическом анализе маркера гипоксии HIF1 α отмечали преимущественно цитоплазматическую локализацию в нейронах, при этом площадь окрашивания достигала 16,7% ($p < 0,005$). При оценке экспрессии нейротрофического фактора головного мозга BDNF не наблюдали достоверных различий с группой контроля (рис. 20).

В группе Опухоль + Li наблюдали преобладание ядерной формы HIF1 α , площадь окрашивания повышалась в сравнении с контролем ($p < 0,05$). При оценке экспрессии BDNF отмечали увеличение площади BDNF⁺-участков на 26,8% ($p < 0,01$) по сравнению с группой Опухоль (см. рис. 20).

Резюме

В группе Контроль + Li наблюдали увеличение экспрессии маркера гипоксии HIF1 α с его преимущественной цитоплазматической локализацией в нейронах.

В группе Опухоль + Li отмечали как цитоплазматическую, так и ядерную форму HIF1 α без изменения уровня экспрессии относительно группы Опухоль. Кроме того, наблюдали увеличение экспрессии BDNF по сравнению с группой Опухоль.

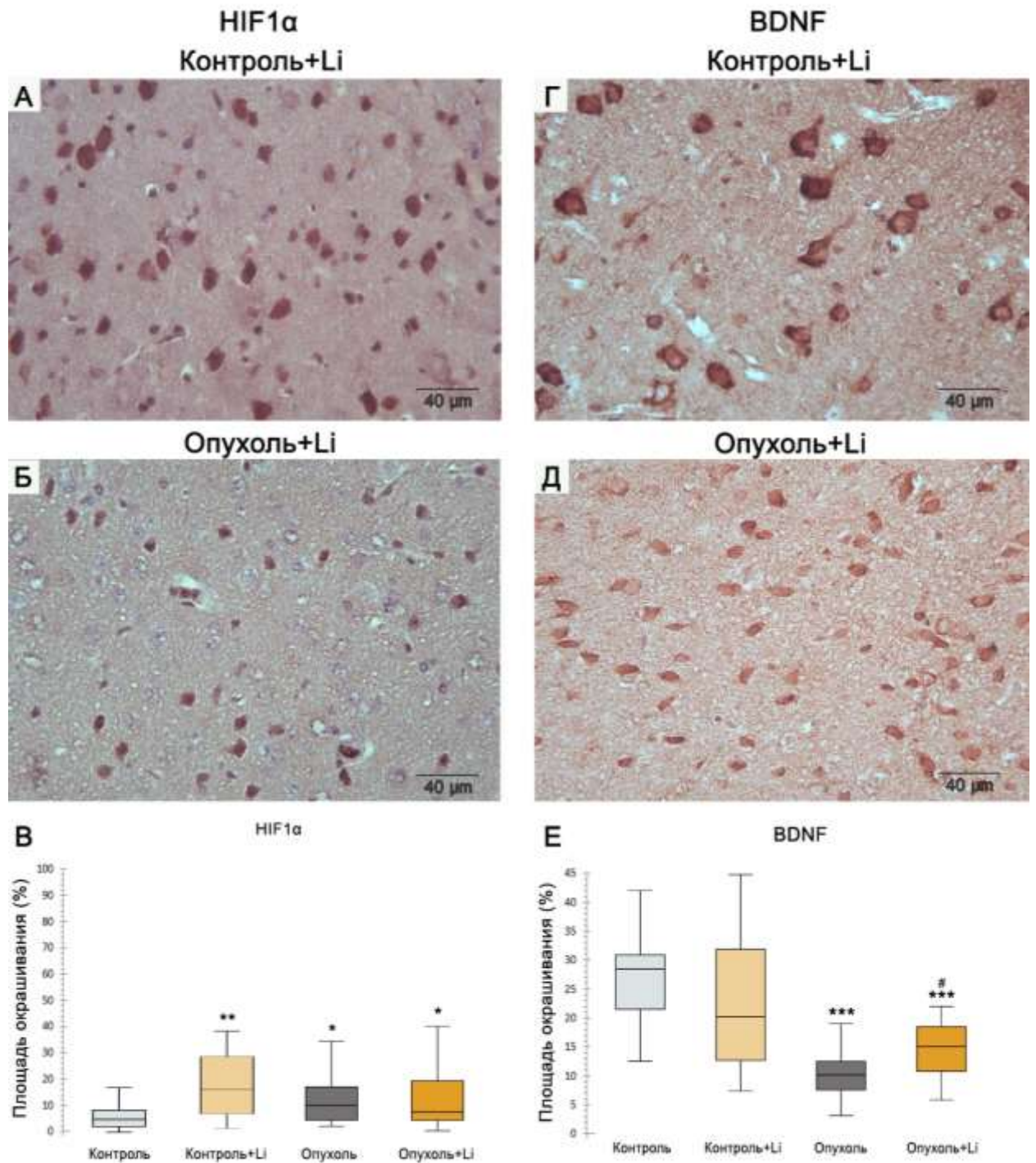


Рисунок 20. Экспрессия маркера гипоксии HIF1 α (А-В) и нейротрофического фактора головного мозга BDNF (Г-Е) в префронтальной коре контрольных животных, принимавших карбонат лития (Контроль + Li) (А) и животных с опухолью, принимавших карбонат лития (Опухоль + Li) (Б). Площадь окрашивания HIF1 α (В) и BDNF (Е). Me(Q1;Q3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой Опухоль.

3.9 Экспрессия HIF1 α и BDNF в префронтальной коре при применении хлорохина при меланоме

В группе Контроль + CQ наблюдали повышение площади окрашивания на маркер гипоксии HIF1 α ($p < 0,0005$) с локализацией в цитоплазме нейронов и единичных эндотелиоцитов. При анализе экспрессии нейротрофического фактора мозга BDNF отмечали двукратное снижение площади окрашивания ($p < 0,0005$) (рис. 21).

В группе Опухоль + CQ выявляли окрашивание HIF1 α в цитоплазме нейронов, однако достоверных различий в площади окрашивания в сравнении с опухолевой группой не наблюдали (см. рис. 21). Площадь окрашивания BDNF была соизмерима с группой Опухоль.

Резюме

При применении хлорохина в условиях периферического опухолевого роста в фрагментах префронтальной коры не наблюдали изменений в экспрессии маркера гипоксии HIF1 α и BDNF по сравнению с группой Опухоль.

В группе Контроль + CQ применение хлорохина вызывало двукратное снижение экспрессии нейротрофического фактора головного мозга BDNF.

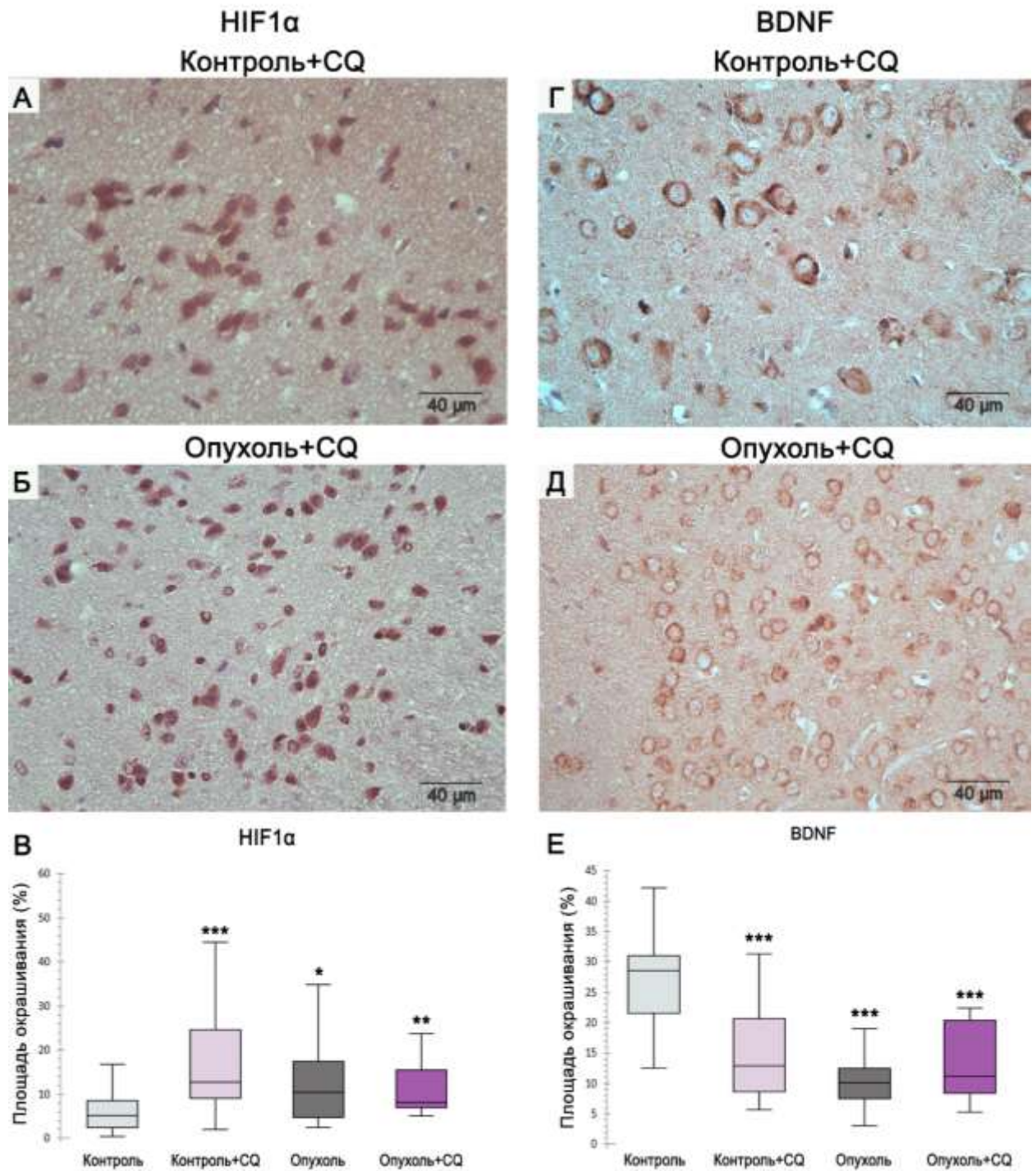


Рисунок 21. Экспрессия маркера гипоксии HIF1α (А-В) и нейротрофического фактора BDNF (Г-Е) в префронтальной коре контрольных животных, принимавших хлорохин (Контроль + CQ) (А) и животных с опухолью, принимавших хлорохин (Опухоль + CQ) (Б). Площадь окрашивания HIF1α (В) и BDNF (Е). Ме (Q1;Q3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контрольной группой.

3.10 Сравнительный анализ изменений в нейронах префронтальной коры и компонентах гематоэнцефалического барьера между исследуемыми группами

Состояние пирамидных нейронов префронтальной коры в исследуемых группах. В условиях моделирования меланомы кожи при исследовании ультраструктуры пирамидных нейронов префронтальной коры наблюдали значительное повышение объемной плотности митохондрий с деструктивными кристами и ЭПР с расширением цистерн. Введение карбоната лития и хлорохина интактным животным не оказывало повреждающего действия на структуру пирамидных нейронов. При применении карбоната лития в условиях моделирования меланомы кожи происходило снижение степени деструкции митохондрий и ЭПР в цитоплазме нейронов. При введении хлорохина отмечали значительное накопление липофусциновых телец. При этом в группе Опухоль + CQ наблюдали снижение ЭПР с расширениями цистерн (рис. 22).

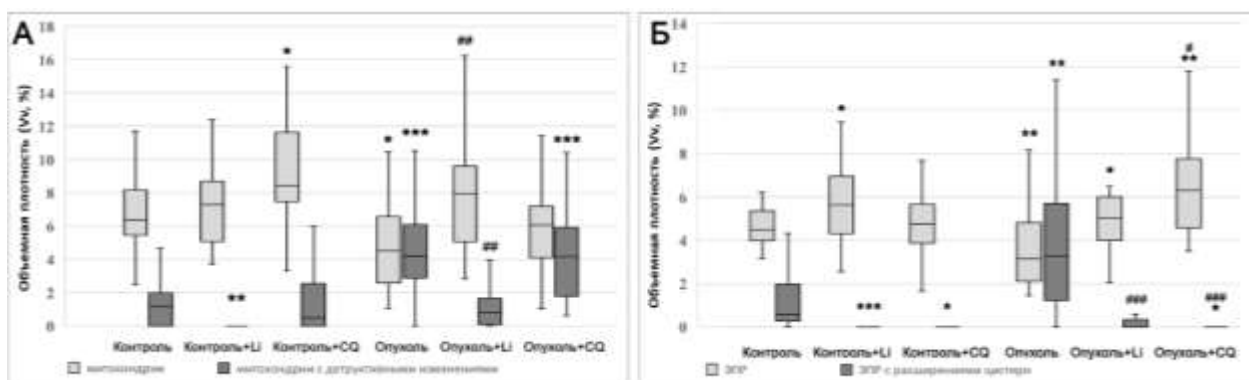


Рисунок 22. Объемная плотность (V_v , %) митохондрий (А) и ЭПР (Б) в цитоплазме пирамидных нейронов префронтальной коры в модели меланомы кожи и применении карбоната лития и хлорохина. Ме (Q1;Q3) * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0005$ по сравнению с контролем. # $p<0,05$; ## $p<0,005$; ### $p<0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

При иммунофлуоресцентном анализе маркера аутофагосом LC3 β в условиях опухолевого роста наблюдали двукратное увеличение его экспрессии. Применение карбоната лития и хлорохина способствовало его снижению до уровня контроля (рис. 23 А).

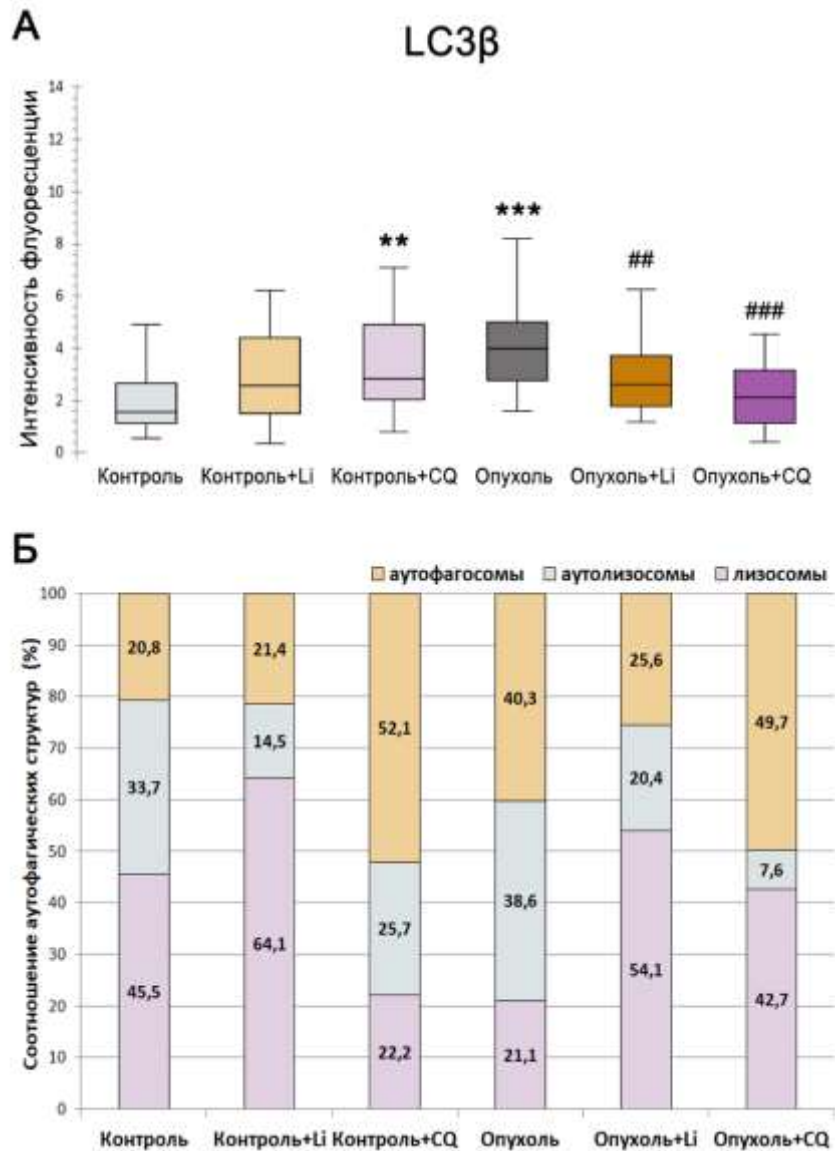


Рисунок 23. Результаты морфометрического и иммунофлуоресцентного анализа аутофагических структур пирамидных нейронов префронтальной коры при меланоме и применении карбоната лития и хлорохина. А – интенсивность флуоресценции маркера LC3 β . Б – соотношение аутофагических структур в пирамидных нейронах. Me(Q1;Q3). ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

При определении соотношения аутофагических структур в группе опухоли отмечали снижение содержания лизосом по сравнению с контролем (рис. 23, Б). При применении карбоната лития соотношение аутофагических структур соответствовало контролю. При применении хлорохина наблюдали повышение содержания аутофагосом и лизосом, а также снижение аутолизосом.

Эффективность межнейронного взаимодействия определяется структурой синапсов. При морфометрическом анализе в группе Опухоль наблюдали

значительное снижение объемной плотности синаптических везикул в пресинаптических структурах нейронов. При применении карбоната лития данный показатель был сравним с группой Опухоль. Хлорохин способствовал повышению плотности синаптических везикул (рис. 24, А).

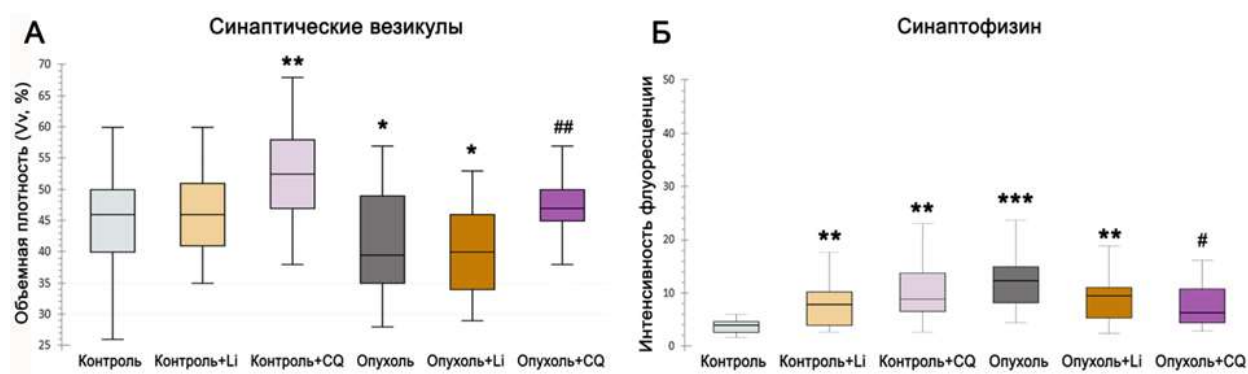


Рисунок 24. Морфометрический и иммунофлуоресцентный анализ синапсов префронтальной коры. А – объемная плотность синаптических везикул. Б – интенсивность флуоресценции синаптофизина в компонентах префронтальной коры. Me(Q1;Q3). * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0005$ по сравнению с контролем; # $p<0,05$; ## $p<0,005$ по сравнению с группой Опухоль.

При иммунофлуоресцентном анализе синаптофизина наблюдали трехкратное повышение его экспрессии в группе Опухоль. Карбонат лития также способствовал его повышению в группе Контроль + Li и снижению относительно опухоли в группе Опухоль + Li. В группе Опухоль + CQ уровень экспрессии синаптофизина соответствовал уровню контроля (рис. 24, Б).

Структура гематоэнцефалического барьера в исследуемых группах. Морфофункциональное состояние нейронов префронтальной коры зависит от структуры гематоэнцефалического барьера. Морфометрический анализ эндотелиоцитов кровеносных капилляров префронтальной коры показал, что наличие опухоли не влияет на объемную плотность люминальных и базальных кавеол, а также митохондрий. Однако в группе Опухоль отмечали значительное повышение объемной плотности свободных транспортных везикул. При этом наблюдали снижение объемной плотности свободных полисом. В группах с применением лития и хлорохина объемная плотность транспортных везикул и полисом сопоставима с контролем (рис. 25, А-Б).

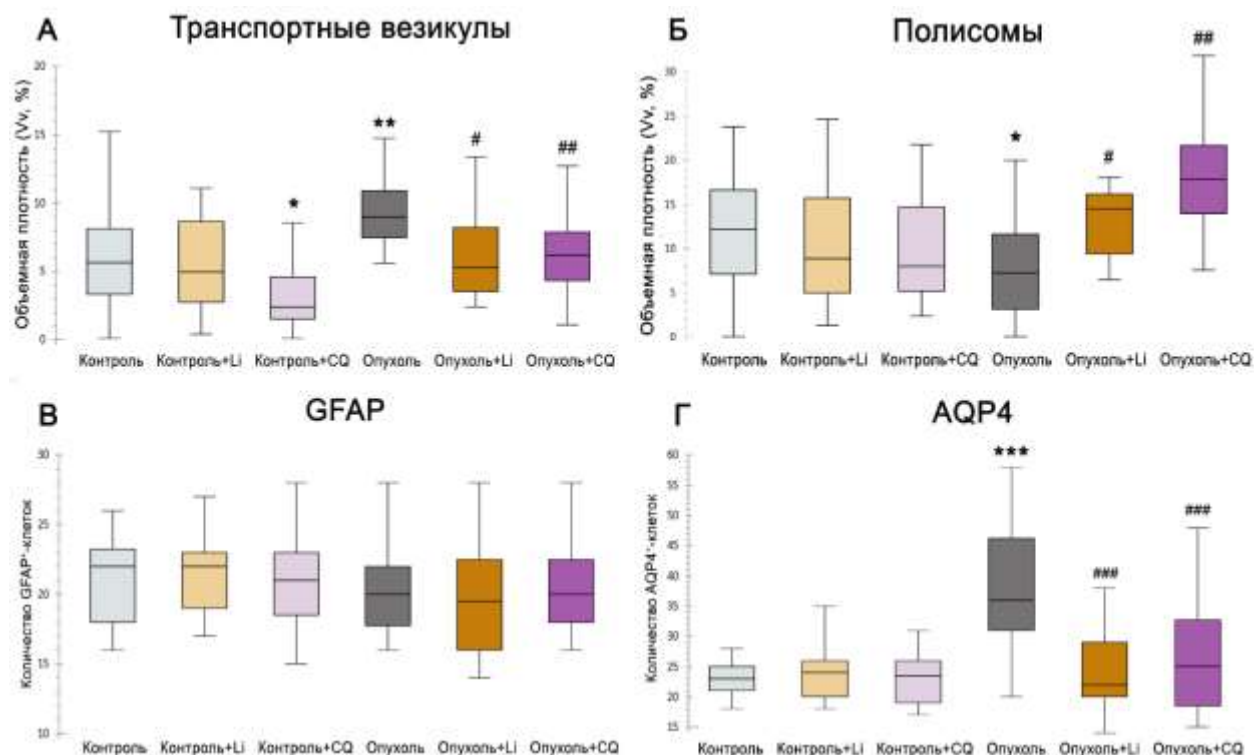


Рисунок 25. Результаты морфометрического и иммунофлуоресцентного анализа структур гематоэнцефалического барьера при меланоме и применении карбоната лития и хлорохина. Объемная плотность транспортных везикул (А) и полисом (Б) в эндотелиоцитах кровеносных капилляров префронтальной коры. Количество GFAP⁺ (В) и AQP4⁺-астроцитов (Г). Ме(Q1;Q3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) является одним из основных компонентов цитоскелета астроцитов и выполняет функцию механической поддержки астроцитов и структуры ГЭБ. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что ни в одной из групп не было достоверных различий в экспрессии маркера астроцитов GFAP в префронтальной коре (рис. 25, В).

AQP4 является основным аквапорином, экспрессируемым на поляризованных мембранах астроцитов и играет ключевую роль в регуляции водного гомеостаза в мозге. Результаты иммунофлуоресцентного анализа свидетельствуют о повышении экспрессии AQP4 в префронтальной коре головного мозга при периферическом опухолевом росте. Применение карбоната лития и хлорохина способствовало восстановлению уровня AQP4 (рис. 25, Г).

Экспрессия фактора гипоксии HIF1 α и нейротрофического фактора мозга BDNF в префронтальной коре. Гипоксия является важным фактором,

влияющим на структуру и функции нейронов. Иммуногистохимический анализ фактора гипоксии HIF1 α показал достоверное увеличение экспрессии данного маркера во всех исследуемых группах (рис. 26, А). Однако локализация была различной. Так, в контрольной группе наблюдали окрашивание цитоплазмы, в группе опухоль – как в цитоплазме, так и в ядрах нейронов. В группах с применением карбоната лития отмечали в большей степени ядерную форму в нейронах, а также окрашивание эндотелия. Цитоплазматическую локализацию связывают с нормоксией, тогда как ядерную локализацию – с активацией транскрипции генов, регулирующих выживание клеток.

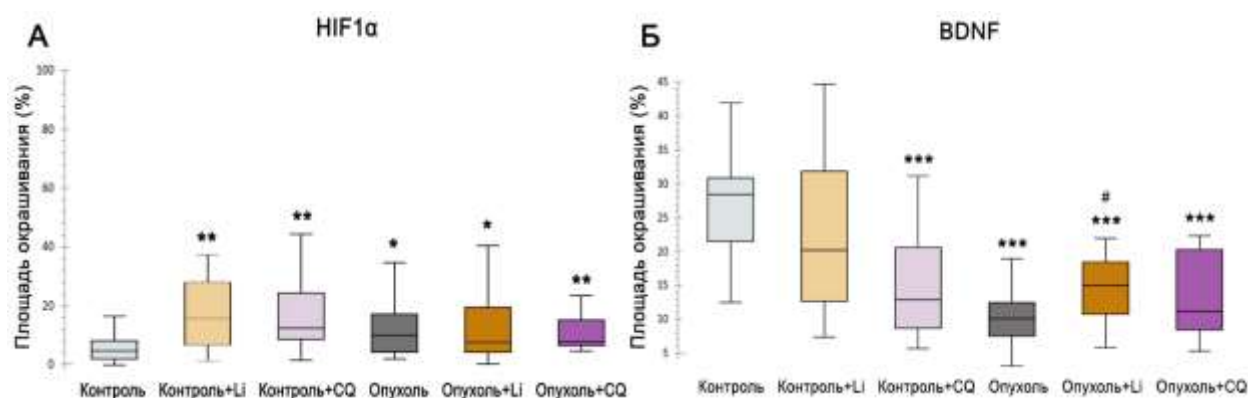


Рисунок 26. Экспрессия HIF1 α (А) и BDNF (Б) в префронтальной коре при меланоме и применении карбоната лития и хлорохина. Ме(Q1;Q3). * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0005$ по сравнению с контролем; # $p<0,05$ по сравнению с группой Опухоль.

Нейротрофический фактор мозга BDNF определяет нейропластичность и выживание нейронов, обеспечивая их адаптацию, рост и защиту от окислительного стресса и повреждений. С помощью иммуногистохимического анализа в группе опухоль было выявлено снижение экспрессии BDNF, хлорохин также способствовал снижению. Применение карбоната лития в группе Опухоль + Li показало повышение уровня экспрессии BDNF на 26,8%, по сравнению с группой опухоль (рис. 26, Б).

Резюме

Сравнительный анализ структурно-функционального состояния префронтальной коры и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в условиях

экспериментального периферического опухолевого роста и воздействия карбонатом лития и хлорохином позволил установить следующее.

Деструктивные изменения митохондрий и ЭПР в пирамидных нейронах, а также дисбаланс аутофагических структур, индуцированные опухолевым ростом, снижаются под действием лития. Хлорохин повышает содержание аутофагосом, лизосом и липофусцина при снижении числа аутолизосом.

В группе Опухоль наблюдается снижение пула синаптических везикул и повышение экспрессии синаптофизина. Литий модулирует уровень синаптофизина, тогда как хлорохин повышает объемную плотность везикул и экспрессию синаптофизина до контрольных значений.

Опухоль-индуцированная дисфункция эндотелия кровеносных капилляров (снижение объемной плотности полисом, повышение транспортных везикул) и повышение экспрессии AQP4 в равной степени устраняются как литием, так и хлорохином, восстанавливая все показатели ГЭБ до контрольных значений.

В нейронах префронтальной коры при опухолевом росте активируется гипоксический ответ (цитоплазматическая и ядерная локализация HIF1 α) и снижается уровень нейротрофического фактора BDNF. Литий усиливает экспрессию обоих факторов с преимущественно ядерной локализацией HIF1 α . Хлорохин, вызывает двукратное снижение BDNF относительно контроля.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В использованной в исследовании модели меланомы B16 не наблюдали метастазов в печени, почках, легких и мозге. Масса животных значимо не различалась между группами в течение эксперимента. Введение карбоната лития или хлорохина не оказывало влияние на объем первичной опухоли (Taskaeva I. et al., 2025).

Настоящее исследование выявило значительные изменения в префронтальной коре головного мозга в модели меланомы кожи, затрагивающие клеточный метаболизм, нейротрофическую поддержку, целостность гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), ультраструктуру нейронов и синаптическую передачу.

Одним из значимых изменений при меланоме стала активация гипоксического ответа, о чем свидетельствовала ядерная локализация HIF-1 α в нейронах префронтальной коры, тогда как в контрольной группе HIF-1 α обнаруживался преимущественно в цитоплазме. HIF-1 α (фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа) является ключевым регулятором клеточных адаптаций к условиям низкого содержания кислорода и играет важную роль в нормальном функционировании мозга. Цитоплазматическую локализацию HIF-1 α связывают с нормоксией, в то время как ядерную локализацию – с активацией транскрипции генов, регулирующих выживание клеток и ангиогенез (Joshi H.P. et al., 2014).

В модели меланомы кожи было отмечено достоверное снижение уровня BDNF – ключевого нейротрофического фактора, регулирующего синаптическую пластичность и выживаемость (Notaras M., van den Buuse M., 2019; Colucci-D'Amato L. et al., 2020). BDNF играет важную роль в росте, развитии и пластичности глутаматергических и ГАМКергических синапсов и посредством модуляции дифференцировки нейронов влияет на серотонинергическую и дофаминергическую нейротрансмиссию. BDNF действует как паракринный и аутокринный фактор как на пресинаптических, так и на постсинаптических участках-мишенях (Colucci-D'Amato L. et al., 2020). Показанное нами достоверное снижение уровня BDNF в префронтальной коре при меланоме можно объяснить тем, что окислительный стресс и активные формы

кислорода (АФК) могут способствовать повреждению нейронов и негативно влиять на синтез BDNF, поскольку АФК вызывают окислительные модификации белков, липидов и нуклеиновых кислот. Кроме того, АФК разрушают клеточные мембраны и клеточные рецепторы и модифицируют активность ферментов и генов. Поэтому считается, что окислительный стресс вызывает нейрональную дисфункцию, нарушая нейротрансмиссию, особенно в отношении сигналов 5-HT (Murawska-Ciałowicz E. et al. 2021).

В группах Контроль + Li и Опухоль + Li наблюдали увеличение экспрессии HIF1 α . Известно, что GSK-3 β опосредует один из двух известных путей деградации для HIF-1. Литий ингибирует GSK-3 β , тем самым повышая активный HIF-1 α (Kast R.E., 2008).

Показано, что введение лития увеличивало экспрессию BDNF в мозге грызунов (Fan M. et al., 2015). В настоящем исследовании в группе Контроль + Li достоверных различий в экспрессии BDNF в префронтальной коре не наблюдали. Однако в модели меланомы кожи применение карбоната лития способствовало повышению уровня BDNF относительно группы Опухоль.

Хлорохин вызывает двукратное снижение площади окрашивания BDNF в фрагментах префронтальной коры как в контроле, так и в условиях опухоли. В исследовании Xu и соавт. (2021) показано, что гидроксихлорохин (производное хлорохина) в фрагментах гиппокампа и миндалевидного тела способствует снижению экспрессии BDNF.

Описанная активация гипоксического ответа, а также снижение нейротрофического фактора мозга в префронтальной коре при моделировании меланомы кожи позволили предположить о нарушении функции гематоэнцефалического барьера.

Гематоэнцефалический барьер представляет собой сложную структуру, включающую в себя эндотелиальные клетки, перициты, базальную мембрану и периваскулярные ножки астроцитов. GFAP является одним из основных компонентов цитоскелета астроцитов и выполняет функцию механической поддержки

астроцитов и структуры ГЭБ (Jurga A.M. et al., 2021). Иммунофлуоресцентный анализ показал, что ни в одной из групп не было достоверных различий в экспрессии маркера астроцитов GFAP в компонентах префронтальной коры.

AQP4 является основным аквапорином, экспрессируемым на поляризованных мембранах астроцитов, и играет ключевую роль в регуляции водного гомеостаза в мозге (Paradopoulos M.C., Verkman A.S., 2007). Результаты настоящего исследования продемонстрировали значительное повышение экспрессии аквапорина 4 (AQP4) в префронтальной коре головного мозга в модели меланомы кожи.

Эти данные согласуются с современными представлениями о том, что AQP4, локализующийся преимущественно на астроцитарных ножках, участвует в регуляции водного обмена и проницаемости гематоэнцефалического барьера (Lan Y.L. et al., 2017). Отмеченное нами повышение экспрессии AQP4 может свидетельствовать о развитии отека и нарушении дренажа интерстициальной жидкости, что характерно для различных нейровоспалительных и онкологических состояний (Haj-Yasein N.N., et al., 2011; Thrane A.S., et al., 2011). Учитывая, что в настоящем исследовании достоверных изменений в экспрессии глиального фибриллярного кислого белка GFAP не наблюдали, можно предположить, что общее количество астроцитов в исследуемых группах не изменялось. Таким образом, увеличение экспрессии AQP4, вероятно, было связано с функциональной активацией астроцитов, а не с их пролиферацией (Wolburg H. et al., 2012).

На ультраструктурном уровне в эндотелиоцитах капилляров префронтальной коры при опухолевом росте было выявлено сужение сосудистого просвета, отек и набухание клеток – морфологические признаки активации эндотелия и сосудистой дисфункции. Подобные изменения могут быть результатом воспалительного ответа на системное опухолевое воздействие (Zhao Z. et al., 2015).

Наблюдавшееся увеличение объемной плотности свободных транспортных везикул (рис. 23, В) в эндотелиоцитах в опухолевой группе, вероятно, свидетельствует об усилении транцитоза, что может обуславливать активацию

везикулярного транспорта и нарушение барьерной функции ГЭБ (Ben-Zvi A. et al., 2014).

При использовании карбоната лития объемная плотность транспортных везикул не отличалась от соответствующих значений в контроле. Эти результаты свидетельствуют о модулирующем влиянии лития на проницаемость ГЭБ (Chiu C.T., Chuang D.M., 2010).

Применение карбоната лития способствовало нормализации уровня экспрессии AQP4 до значений, сопоставимых с контрольной группой, что может свидетельствовать о его потенциальном протективном эффекте при опухолеиндуцированных нарушениях ГЭБ. Нормализация экспрессии AQP4 при введении карбоната лития может быть связана с его влиянием на поляризацию астроцитов и регуляцию водного транспорта. Действие хлорохина по отношению к уровню экспрессии AQP4 в префронтальной коре в модели меланомы кожи схоже с действием карбоната лития. В настоящее время не имеется литературных данных, описывающих действие хлорохина на экспрессию AQP4.

Таким образом, в условиях моделирования меланомы кожи в префронтальной коре наблюдается повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, которое может привести к морфофункциональным изменениям нейронов.

В настоящем исследовании в условиях развития меланомы кожи наблюдали изменения в структуре пирамидных нейронов. Наиболее выраженными изменениями в нейронах префронтальной коры головного мозга экспериментальных животных были нарушения структуры митохондрий и ЭПР.

Митохондрии играют важную роль функции нейронов, влияя на нейронную активность, нейронную пластичность и поведенческую адаптацию. Они ответственны за производство энергии и обеспечение субстратов для роста клетки (Madireddy S., Madireddy S., 2022). Дисфункциональные митохондрии продуцируют высокие уровни активных форм кислорода, которые могут негативно влиять на определенные митохондриальные компоненты, включая

мембранные липиды и компоненты окислительного фосфорилирования (Shoshan-Barmatz V. et al., 2018). Окислительный стресс приводит не только к мутациям в мтДНК и повреждению цепи транспорта электронов, но также к изменениям проницаемости мембран, механизмов защиты митохондрий и уровня кальция. Центральная нервная система особенно уязвима для окислительного стресса, поскольку мозг использует большое количество кислорода, что увеличивает выработку свободных радикалов и активных форм кислорода (Madireddy S., Madireddy S., 2022).

Функции митохондрий и ЭПР взаимосвязаны. Между ними обеспечивается обмен ионов кальция, доставка активных форм кислорода, сортировка липидов (Stacchiotti A. et al., 2018). Кроме того, АТФ, продуцируемый митохондриальным окислительным фосфорилированием, является источником энергии для правильного фолдинга белков в ЭПР (Wang L. et al., 2022). В нашем исследовании при меланоме кожи в пирамидных нейронах отмечали расширение цистерн гранулярного ЭПР, что, как описано у Mateus D. et al. (2018), является морфологическим проявлением стресса ЭПР.

Данные литературы свидетельствуют о том, что литий является нейропротектором. Как рассмотрено у Ghanaatfar F. и соавт. (2023), путем модулирования сигнальных путей PI3/Akt/GSK3 β и PI3/Akt/CREB/BDNF, он вызывает снижение окислительного стресса, ингибирование митохондриальной дисфункции, воспаления и апоптоза.

Ингибирование GSK3 β является основным механизмом нейропротекторного действия лития (Young W., 2009; Li Q. et al. 2010). Chen B. и соавт. (2022) показали, что на молекулярном уровне Li⁺ ингибирует активацию GSK3 β , стимулируя АКТ. Инактивированный GSK3 β впоследствии снижает деградацию цитоплазматического β -катенина, который переносится в ядро с образованием комплексов β -катенин/TCF4. В то же время АКТ, стимулированная ионами Li⁺, увеличивает фосфорилирование цитоплазматического FoxO3a, что приводит к выходу FoxO3a из ядра. Ядерный FoxO3a конкурирует

с сайтами связывания β -катенина с TCF4, поэтому снижение ядерного FoxO3a, индуцированное Li^+ , дополнительно усиливает образование комплексов β -катенин/TCF4. Эти комплексы фосфорилируют STAT3, что способствует экспрессии UCP2. Последнее снижает выработку АФК в митохондриях. В настоящем исследовании в группе с применением карбоната лития показано снижение объемной плотности митохондрий с деструктивными изменениями. Кроме того, Abu-Hijleh F.A. et al. (2021) показали, что терапевтический механизм лития включает поддержание гомеостаза ЭПР за счет модуляции нескольких белков UPR. В группе Опухоль + Li нами отмечено, что объемная плотность ЭПР и ЭПР с расширением цистерн достигает уровня интактного контроля.

В ряде исследований показано, что хлорохин способствует стрессу ЭПР посредством ингибирования процесса аутофагии (Zhou J. et al., 2017; Jia B. et al., 2018; Tian A.L. et al., 2021). Однако в нашем исследовании показано снижение объемной плотности ЭПР с расширениями цистерн, являющегося признаком стресса ЭПР. В исследовании Morimura T. и соавт. (2014) отмечается также снижение признаков стресса ЭПР, в частности, снижение экспрессии Grp78.

Окислительный стресс, развивающийся при опухолевом росте, вызванный накоплением активных форм кислорода, а также стресс ЭПР и последующая реакция развернутого белка (UPR), могут привести к активации процесса аутофагии (Galati S. et al., 2019; Bhardwaj M. et al., 2020). Выявленное в нашем исследовании преобладание аутофагосом является подтверждением развития процесса аутофагии в нейронах префронтальной коры в условиях моделирования меланомы кожи.

Хлорохин рассматривается как потенциальный противоопухолевый агент, действующий через ингибирование процесса аутофагии путем нарушения слияния аутофагосом с лизосомами (Mauthe M. et al., 2018). Он ингибирует аутофагию не только в опухолевых клетках, но и в нейронах префронтальной коры. В группе Опухоль + CQ нами отмечено накопление аутофагосом и лизосом и снижение аутолизосом.

Кроме того, в группе с хлорохином в нейронах многократно повысилось содержание липофусциновых телец, что, по-видимому, может быть признаком нейротоксичности. Имеются данные о корреляции между нарушением аутофагии и накоплением липофусциновых телец (Song S.B. et al., 2023). Липофусцины представляют собой окисленные комплексы липидов и белков. При нейродегенеративных заболеваниях накопление агрегатов липофусцина увеличивается не только с возрастом, но и в ходе патологических процессов, таких как утрата нейронов, пролиферация и активация глиальных клеток, а также при различных клеточных изменениях, включая окислительный стресс, дисфункцию протеасом, лизосом и митохондрий (Moreno-García A. et al., 2018).

Литий способен регулировать процесс аутофагии, усиливая деградацию белков при нейродегенеративных заболеваниях. Однако при различных патологических заболеваниях влияние лития на аутофагию может быть как индуцирующим, так и ингибирующим. Например, при болезни Хантингтона препараты лития активируют процесс аутофагии через mTOR-независимый путь (Hamano T. et al., 2021) посредством ингибирования инозитолмонофосфатазы (Motoi Y. et al., 2014). Напротив, мышинные модели болезни Альцгеймера и церебральной ишемии показали снижение аутофагической активности путем ингибирования GSK3 β (Sarkar S. et al., 2008). В настоящем исследовании в группе с применением лития соотношение аутофагических структур было аналогичным группе контроля, то есть преобладали лизосомы. Можно предположить, что при действии лития мы наблюдали уже завершённый процесс аутофагии, так как наблюдалось значительное снижение деструктивных органелл. Тогда как в группе опухоли преобладали аутофагосомы и наблюдалось многократное увеличение деструктивных органелл в нейронах, что указывает на нарушение процесса аутофагии.

Следствием выявленных нарушений стали изменения в синаптических структурах нейронов префронтальной коры. Синапсы являются важнейшими

структурами, выполняющими функцию передачи сигнала между нейронами. Синаптофизин является одним из основных белков синаптических везикул, регулирующих экзоцитоз нейромедиаторов. В исследовании Chang C.W. и соавт. (2021) продемонстрировано, что синаптофизин образует белковую пору или канал в мембране синаптической везикулы, которая играет ключевую роль в инициации слияния везикулы с пресинаптической мембраной.

Морфометрический анализ в данном исследовании показал в условиях моделирования меланомы кожи достоверное снижение как количества синапсов, так и объемной плотности синаптических везикул. Увеличение экспрессии синаптофизина в группе опухоли указывает на возможный компенсаторный эффект.

В группе Контроль + Li отмечали увеличение количества синапсов на 21,2%. Однако при меланоме литий способствовал снижению количества синапсов, достигая уровня группы Опухоль. Литий не повлиял на изменения объемной плотности синаптических везикул в пресинаптических терминалях префронтальной коры, однако способствовал повышению экспрессии синаптофизина. Литий воздействует на синапсы, ингибируя GSK3 β , повышая регуляцию нейротрофинов и их рецепторов, а также снижая уровень рецепторов глутамата AMPA на клеточной поверхности. Многие молекулярные механизмы действия лития связаны с активностью и экспрессией постсинаптических рецепторов (Zelada D. et al., 2021).

В настоящем исследовании хлорохин в группе Опухоль + CQ способствовал повышению объемной плотности синаптических везикул в синапсах, что соизмеримо с данным показателем в контрольной группе, а также снижению экспрессии синаптофизина до уровня контроля. Тогда как в группе Контроль + CQ наблюдалось повышение объемной плотности транспортных везикул, увеличение интенсивности флуоресценции синаптофизина. Возможной причиной увеличения числа синаптических везикул под действием хлорохина может быть ингибирование процесса аутофагии.

Известно, что системное воспаление, индуцированное ростом опухоли, является ключевым звеном, связывающим периферическую патологию с дисфункцией ЦНС. Анализ цитокинового профиля, проведенный коллегами (Taskaeva I. et al., 2025), показал высокий уровень экспрессии провоспалительного цитокина IL-1 α в ткани опухоли. Полученные данные о снижении IL-1 α в опухоли под влиянием лития и хлорохина согласуются с представлениями о способности этих агентов модулировать воспалительный ответ. Учитывая, что IL-1 усиливает инвазивный потенциал меланомы и коррелирует с плохим прогнозом (Gelfo et al., 2020; Singh et al., 2021), выявленное снижение его уровня можно рассматривать как потенциально благоприятный эффект.

В нашем исследовании (Obanina N. et al., 2024) в модели меланомы кожи в префронтальной коре наблюдали увеличение экспрессии генов колониестимулирующих факторов (Г-КСФ и ГМ-КСФ). Повышение ГМ-КСФ в ЦНС обычно рассматривается как реакция микроглии на повреждение нейронов и может отражать активацию нейровоспаления (Dikmen H.O. et al., 2020). На этом фоне применение карбоната лития способствовало увеличению экспрессии противовоспалительного цитокина IL-4, что может быть одним из возможных механизмов нейропротекторного действия лития.

Префронтальная кора играет большую роль во многих функциях мозга, включая регуляцию эмоций, мотивацию и общительность. Поражение структур префронтальной коры связывают с развитием депрессии (Xu P. et al., 2019). Выявлено, что у 20% онкобольных пациентов наблюдается развитие депрессии, что влияет на их качество жизни, желание к лечению, выживаемость (Pitman A. et al., 2018). Опухоль-индуцированная депрессия в последнее время активно обсуждается в литературе, и представляет собой термин, обозначающий обширный симптомокомплекс психоэмоциональных расстройств, связанных с раком (Yang S., et al., 2019). Отмеченные нами структурно-функциональные изменения в префронтальной коре исследуемых животных могут быть основой нарушения когнитивных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, настоящее исследование позволило установить каскад взаимосвязанных патологических изменений в префронтальной коре, индуцированных опухолью меланомы B16, и оценить потенциал коррекции выявленных нарушений модуляторами аутофагии.

Первичным звеном выступает дисфункция гематоэнцефалического барьера, проявляющаяся в активации трансцитозного транспорта и функциональной перестройке астроцитарной глии с повышением экспрессии AQP4, что создает условия для проникновения провоспалительных медиаторов в ЦНС. Далее в нейронах развивается ряд нарушений: развитие окислительного стресса и стресса ЭПР, активация гипоксического ответа (ядерная локализация HIF1 α), нарушение аутофагического потока с накоплением дефектных органелл. Следствием выявленных метаболических нарушений становится синаптическая дисфункция, характеризующаяся снижением количества синапсов и нарушением везикулярного аппарата, что может непосредственно обуславливать снижение когнитивных функций, ассоциированное с онкопатологией.

Карбонат лития продемонстрировал комплексное нейропротекторное действие, корригируя нарушения на всех уровнях патологического каскада – от стабилизации ГЭБ до восстановления ультраструктуры нейронов и нормализации аутофагического потока. Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшего изучения препаратов лития для коррекции церебральных осложнений онкологических заболеваний.

Хлорохин демонстрирует двойственное действие. С одной стороны, он, подобно литию, нормализует некоторые параметры ГЭБ и снижает стресс ЭПР. С другой стороны, он ингибирует аутофагию, вызывает накопление липофусцина, снижает уровень BDNF и количество синапсов, что указывает на его нейротоксическое действие.

ВЫВОДЫ

1. В условиях моделирования меланомы кожи в пирамидных нейронах префронтальной коры развиваются выраженные ультраструктурные изменения: значительное увеличение объемной плотности митохондрий с деструктивными кристами, расширение цистерн эндоплазматического ретикулума, снижение объемной плотности свободных полисом, что указывает на нарушение энергетического обмена и синтетической функции клеток.

2. Применение карбоната лития в условиях моделирования меланомы кожи приводит к снижению объемной плотности органелл с деструктивными изменениями в цитоплазме нейронов. Введение хлорохина обуславливает чрезмерное накопление липофусциновых телец.

3. При моделировании меланомы кожи в пирамидных нейронах отмечается преобладание аутофагосом и повышение уровня экспрессии LC3 β на фоне накопления поврежденных органелл, что указывает на нарушение процесса аутофагии. Введение карбоната лития способствует завершенности аутофагии, о чем свидетельствует восстановление баланса аутофагических структур и снижение объемной плотности деструктивных органелл.

4. Первичная меланома кожи B16 вызывает развитие структурных признаков дисфункции синапсов, выражающейся в снижении плотности синаптических везикул при компенсаторном увеличении экспрессии синаптофизина. Карбонат лития модулирует функциональное состояние синапсов, повышая экспрессию синаптофизина.

5. При первичной меланоме кожи активируется транцитоз и повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера, что подтверждается усилением экспрессии AQP4 в астроцитах и увеличением плотности транспортных везикул в эндотелиоцитах кровеносных капилляров. Карбонат лития способствует восстановлению барьерной функции гематоэнцефалического барьера.

6. При развитии первичной меланомы кожи увеличивается экспрессия HIF1 α в цитоплазме и ядре и снижается уровень BDNF. Хлорохин усиливает экспрессию HIF1 α как в ядре, так и цитоплазме. Карбонат лития способствует ядерной локализации HIF1 α и восстановлению экспрессии BDNF.

7. В условиях моделирования меланомы кожи в пирамидных нейронах и гематоэнцефалическом барьере развиваются деструктивные изменения. Введение карбоната лития оказывает нейропротекторный эффект, способствуя сохранению структурной организации компонентов префронтальной коры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМФК – 5'-аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
- АОТ – адсорбционно-опосредованный трансцитоз
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- БМ – базальная мембрана
- Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- гЭПР – гранулярный эндоплазматический ретикулум
- ИЛ – интерлейкин
- ИМФ – инозитолмонофосфатаза
- ИНФ γ – интерферон γ
- ММП – матриксная металлопротеиназа
- РОТ – рецептор-опосредованный трансцитоз
- ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа
- ЦНС – центральная нервная система
- ШОА – шаперон-опосредованная аутофагия
- 5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин)
- АВС-транспортеры – АТФ-связывающие кассетные транспортеры
- Akt-1 – серин-треониновая протеинкиназа α
- AQP4 – водный канал, аквапорин 4
- ATG9 – белок, связанный с аутофагией 9 (AuTophagy-related protein 9)
- BDNF – нейротрофический фактор мозга
- CaMKK β – кальций-кальмодулин-зависимая киназа киназа- β
- CQ – хлорохин
- FoxO3a – транскрипционный фактор подкласса O семейства Forkhead box, член 3a.
- GFAP – глиальный фибриллярный кислотный белок
- Grp78 – глюкозо-регулируемый белок, 78 кДа (Glucose-regulated protein, 78 kDa)

GSK3 β – гликогенсинтаза-киназа 3 бета

HIF1 α – гипоксия-индуцированный фактор 1 альфа

ICAM-1 – межклеточная адгезионная молекула-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)

JAM-1 – контактная адгезионная молекула -1 (Junctional Adhesion Molecule -1)

LC3 β – маркер аутофагии (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)

Li – литий (карбонат лития)

mTORC1 – мишень рапамицина у млекопитающих, комплекс 1

NF- κ B – ядерный фактор каппа-легкой цепи-энхансер активированных В-клеток

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор

PI3K CIII – фосфотидилинозитол-3-киназа класса III

PINK1 – PTEN-индуцируемая киназа 1

SLC – транспортеры (переносчики) растворенных веществ (Solute Carrier family)

STAT3 – передатчиком сигнала и транскрипционный фактор (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)

TCF4 – фактор Т-клеток 4 / транскрипционный фактор 4 (T-cell Factor 4)

TEM – трансмиссионная электронная микроскопия

TGF β – трансформирующий фактор роста β

ULK1 – серин-треониновая протеинкиназа, основной иницирующий комплекс для запуска аутофагии (Unc-51-like kinase 1)

UPR – реакция на неправильно свернутые белки (Unfolded Protein Response)

VCAM-1 – молекула клеточной адгезии сосудов 1

Vv – объемная плотность (%)

ZO-1 – белок плотных контактов 1 (Zonula Occludens-1)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. 2-е изд. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
2. Гоголева И.В., Громова О.А., Торшин И.Ю., Гришина Т.Р., Пронин А.В. Нейробиологическая роль солей лития // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. Т. 122, №11. – С. 17-23. – DOI: 10.17116/jnevro202212211117.
3. Дедов И.И., Смирнова О.М., Горелышев А.С. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека // Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т. 58, №5. – С. 57-65.
4. Королев М.А., Рачковская Л.Н., Мадонов П.Г., Шурлыгина А.В., Рачковский Э.Э., Летягин А.Ю., Коненков В.И., Чуринов А.А., Дубская Т.Ю., Ветошкина Т.В., Сандрикина Л.А., Фомина Т.И., Федорова Е.П. Оценка острой токсичности лекарственного средства на основе комплекса лития цитрата, полиметилсилоксана, оксида алюминия // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – №5. – DOI: 10.15372/SSMJ20200505.
5. Пронин А.В., Громова О.А., Торшин И.Ю., Стельмашук Е.В., Александрова О.П., Генрихс Е.Е., Хаспеков Л.Г. О нейропротективных свойствах солей лития в условиях глутаматного стресса // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2017. Т. 9, №3. – С. 111-119. – DOI: 10.14412/2074-2711-2017-3-111-119.
6. Файрушина А.И., Хисматуллина З.Р. Морфология нейронов и глиальных клеток переднего кортикального ядра амигдалы у крыс линии WAG/Rij // Лабораторные животные для научных исследований. – 2025. – №3. – DOI: 10.57034/2618723X-2025-03-06.
7. Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R., Begley D. J. Structure and function of the blood-brain barrier // Neurobiology of disease. – 2010. – Vol. 37, № 1. – P. 13–25. – DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
8. Abu-Hijleh F. A., Prashar S., Joshi H., Sharma R., Frey B. N., Mishra R.

K. Novel mechanism of action for the mood stabilizer lithium // *Bipolar disorders*. – 2021. – Vol. 23, № 1. – P. 76–83. – DOI: 10.1111/bdi.13019.

9. Ando Y., Okada H., Takemura G., Suzuki K., Takada C., Tomita H., Zai-kokuji R., Hotta Y., Miyazaki N., Yano H., Muraki I., Kuroda A., Fukuda H., Kawasaki Y., Okamoto H., Kawaguchi T., Watanabe T., Doi T., Yoshida T., Ushikoshi H., Ogura S. Brain-specific ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx and its possible contribution for blood brain barrier // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – Article 17523. – DOI: 10.1038/s41598-018-35976-2.

10. Andreone B. J., Chow B. W., Tata A., Lacoste B., Ben-Zvi A., Bullock K., Deik A. A., Ginty D. D., Clish C. B., Gu C. Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis // *Neuron*. – 2017. – Vol. 94, № 3. – P. 581–594.e5. – DOI: 10.1016/j.neuron.2017.03.043.

11. Aragón-González A., Shaw P. J., Ferraiuolo L. Blood-brain barrier disruption and its involvement in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 23. – Article 15271. – DOI: 10.3390/ijms232315271.

12. Asgari M. M., Maruti S. S., White E. Association between lithium use and melanoma risk and mortality // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2017. – Vol. 137, № 11. – P. 2337–2343. – DOI: 10.1016/j.jid.2017.05.034.

13. Argaw A.T., Gurfein B.T., Zhang Y., Zameer A., John G.R. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, №6. – P. 1977–1982. – DOI: 10.1073/pnas.0808698106.

14. Ayloo S., Gu C. Transcytosis at the blood-brain barrier // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2019. – Vol. 57. – P. 32–38. – DOI: 10.1016/j.conb.2018.12.014.

15. Banks W. A., Reed M. J., Logsdon A. F., Rhea E. M., Erickson M. A. Healthy aging and the blood–brain barrier // *Nat Aging*. – 2021. – Vol. 1. – P. 243–254. – DOI: 10.1038/s43587-021-00043-5.

16. Barmaki H., Nourazarian A., Khaki-Khatibi F. Proteostasis and neurodegeneration: a closer look at autophagy in Alzheimer's disease // *Front. Aging Neurosci.* – 2023. – Vol. 15. – Article 1281338. – DOI: 10.3389/fnagi.2023.1281338.
17. Ben-Zvi A., Lacoste B., Kur E., Andreone B. J., Mayshar Y., Yan H., Gu C. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood–brain barrier // *Nature.* – 2014. – Vol. 509. – P. 507–511. – DOI: 10.1038/nature13324.
18. Bevona C., Goggins W., Quinn T., Fullerton J., Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi // *Arch. Dermatol.* – 2003. – Vol. 139, № 12. – P. 1620–1624. – DOI: 10.1001/archderm.139.12.1620.
19. Betz A. L., Goldstein G. W. Polarity of the blood-brain barrier: Neutral amino acid transport into isolated brain capillaries // *Science.* – 1978. – Vol. 202, № 4369. – P. 225–227. – DOI: 10.1126/science.211586.
20. Bgatova N., Obanina N., Taskaeva I., Makarova V., Rakhmetova A., Shatskaya S., Khotskin N., Zavjalov E. Accumulation and neuroprotective effects of lithium on hepatocellular carcinoma mice model // *Behavioural Brain Research.* – 2024. – Vol. 456. – Article 114679. – DOI: 10.1016/j.bbr.2023.114679.
21. Bhardwaj M., Leli N. M., Koumenis C., Amaravadi R. K. Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses // *Semin. Cancer Biol.* – 2020. – Vol. 66. – P. 116–128. – DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.11.007.
22. Byrnes K., Blessinger S., Bailey N. T., Scaife R., Liu G., Khambu B. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 33–49. – DOI: 10.1016/j.apsb.2021.07.021.
23. Cao Z. Beclin-1: a therapeutic target at the intersection of autophagy and apoptosis // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – Article 1506426. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1506426.
24. Caraviello C., Nazzaro G., Tavoletti G., Boggio F., Denaro N., Murgia G., Passoni E., Benzecry Mancin V., Marzano A.V. Melanoma Skin Cancer: A Comprehensive Review of Current Knowledge // *Cancers (Basel).* – 2025. Vol. 17, №17. – Article 2920. – DOI: 10.3390/cancers17172920.

25. Casaril A.M., Dantzer R., Bas-Orth C. Neuronal Mitochondrial Dysfunction and Bioenergetic Failure in Inflammation-Associated Depression // *Frontiers in neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – 725547. – DOI: 10.3389/fnins.2021.725547.
26. Castro Dias M., Mapunda J. A., Vladymyrov M., Engelhardt B. Structure and junctional complexes of endothelial, epithelial and glial brain barriers // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 21. – Article 5372. – DOI: 10.3390/ijms20215372.
27. Chang C. W., Hsiao Y. T., Jackson M. B. Synaptophysin Regulates Fusion Pores and Exocytosis Mode in Chromaffin Cells // *J. Neurosci.* – 2021. – Vol. 41, № 16. – P. 3563–3578. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2833-20.2021.
28. Chavez-Valdez R., Flock D.L., Martin L.J., Northington F.J. Endoplasmic reticulum pathology and stress response in neurons precede programmed necrosis after neonatal hypoxia-ischemia // *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. – 2016. – Vol. 48. – P. 58–70. – DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2015.11.007.
29. Chen T., Dai Y., Hu C., Lin Z., Wang S., Yang J., Zeng L., Li S., Li W. Cellular and molecular mechanisms of the blood-brain barrier dysfunction in neurodegenerative diseases // *Fluids Barriers CNS*. – 2024. – Vol. 21, № 1. – Article 60. – DOI: 10.1186/s12987-024-00557-1.
30. Chen B., Zhang M., Ji M., et al. The neuroprotective mechanism of lithium after ischaemic stroke // *Commun. Biol.* – 2022. – Vol. 5, № 1. – P. 105. – DOI: 10.1038/s42003-022-03051-2.
31. Chen X., Geng Y., Wei G., He D., Lv J., Wen W., Xiang F., Tao K., Wu C. Neural circuitries between the brain and peripheral solid tumors // *Cancer Res.* – 2024. – Vol. 84. – P. 3509–3521. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-24-1779.
32. Chen D., Xie J., Fiskesund R., Dong W., Liang X., Lv J., Jin X., Liu J., Mo S., Zhang T., Cheng F., Zhou Y., Zhang H., Tang K., Ma J., Liu Y., Huang B. Chloroquine modulates antitumor immune response by resetting tumor-associated macrophages toward M1 phenotype // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9, № 1. – Article 873. – DOI: 10.1038/s41467-018-03225-9.

33. Chiu C. T., Chuang D. M. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders // *Pharmacol. Ther.* – 2010. – Vol. 128, № 2. – P. 281–304. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.07.006.
34. Collins K.P., Jackson K.M., Gustafson D.L. Hydroxychloroquine: A Physiologically-Based Pharmacokinetic Model in the Context of Cancer-Related Autophagy Modulation // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2018. – Vol. 365, №3. – P. 447-459. – DOI: 10.1124/jpet.117.245639.
35. Colucci-D'Amato L., Speranza L., Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 20. – P. 7777. – DOI: 10.3390/ijms21207777.
36. DeBault L. E., Cancilla P. A. gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: Induction by glial cells in vitro // *Science.* – 1980. – Vol. 207, № 4426. – P. 653–655. – DOI: 10.1126/science.6101511.
37. Del Grosso A., Parlanti G., Angella L., Giordano N., Tonazzini I., Ottalagana E., Carpi S., Pellegrino R. M., Alabed H. B. R., Emiliani C., Caleo M., Cecchini M. Chronic lithium administration in a mouse model for Krabbe disease // *JIMD Rep.* – 2021. – Vol. 63, № 1. – P. 50–65. – DOI: 10.1002/jmd2.12258.
38. Dempsey E. W., Wislocki G. B. An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1955. – Vol. 1, № 3. – P. 245–256. – DOI: 10.1083/jcb.1.3.245.
39. Dikmen H. O., Hemmerich M., Lewen A., Hollnagel J. O., Chausse B., Kann O. GM-CSF induces noninflammatory proliferation of microglia and disturbs electrical neuronal network rhythms in situ // *J. Neuroinflammation.* – 2020. – Vol. 17, №1. – 235. – DOI: 10.1186/s12974-020-01903-4.
40. Dmytriv T.R., Duve K.V., Storey K.B., Lushchak V.I. Vicious cycle of oxidative stress and neuroinflammation in pathophysiology of chronic vascular encephalopathy // *Frontiers in physiology.* – 2024. – Vol. 15. – 1443604. – DOI: 10.3389/fphys.2024.1443604.

41. Duncan D.J., Yang Z., Hopkins P.M., Steele D.S., Harrison S.M. TNF- α and IL-1 β increase Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes // *Cell calcium*. – 2010. – Vol. 47, №4. – P. 378–386. – DOI: 10.1016/j.ceca.2010.02.002.
42. Dzwierzynski W. W. Melanoma risk factors and prevention // *Clin. Plast. Surg.* – 2021. – Vol. 48, № 4. – P. 543–550. – DOI: 10.1016/j.cps.2021.05.001.
43. Ehrlich P. Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus-Eine Farbenanalytische Studie. Berlin: A. Hirschwald, 1885. – 176 p.
44. Erickson M.A., Banks W.A. Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions // *Pharmacol. Rev.* – 2018. – Vol. 70, № 2. – P. 278–314. – DOI: 10.1124/pr.117.014647.
45. Fan M., Jin W., Zhao H., et al. Lithium chloride administration prevents spatial learning and memory impairment in repeated cerebral ischemia-reperfusion mice by depressing apoptosis and increasing BDNF expression in hippocampus // *Behav. Brain Res.* – 2015. – Vol. 291. – P. 399–406. – DOI: 10.1016/j.bbr.2015.05.047.
46. Fernandes B.S., Molendijk M.L., Köhler C.A., Soares J.C., Leite C.M., Machado-Vieira R., Ribeiro T.L., Silva J.C., Sales P.M., Quevedo J., Oertel-Knöchel V., Vieta E., González-Pinto A., Berk M., Carvalho A.F. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker in bipolar disorder: a meta-analysis of 52 studies // *BMC Med.* – 2015. – Vol. 13. – Article 289. – DOI: 10.1186/s12916-015-0529-7.
47. Filippone A., Esposito E., Mannino D., Lyssenko N., Praticò D. The contribution of altered neuronal autophagy to neurodegeneration // *Pharmacol. Ther.* – 2022. – Vol. 238. – Article 108178. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108178.
48. Galati S., Boni C., Gerra M.C., Lazzaretti M., Buschini A. Autophagy: A Player in response to Oxidative Stress and DNA Damage // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – Article ID 5692958. – DOI: 10.1155/2019/5692958.

49. Galea I. The blood-brain barrier in systemic infection and inflammation // *Cell Mol. Immunol.* – 2021. – Vol. 18, № 11. – P. 2489–2501. – DOI: 10.1038/s41423-021-00757-x.
50. Gatica D., Lahiri V., Klionsky D.J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy // *Nat. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 20, № 3. – P. 233–242.
51. Ge H., Xu C., Chu L. Comprehensive review of mouse models for studying cancer-related fatigue: Methods, findings and future directions (Review) // *Experimental and therapeutic medicine.* – 2025. – Vol. 30, №3. – P. 178. – DOI: 10.3892/etm.2025.12928.
52. Gelfo V., Romaniello D., Mazzeschi M., Sgarzi M., Grilli G., Morselli A., Manzan B., Rihawi K., Lauriola M. Roles of IL-1 in Cancer: From Tumor Progression to Resistance to Targeted Therapies // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, №17. – 6009. – DOI: 10.3390/ijms21176009.
53. Ghanaatfar F., Ghanaatfar A., Isapour P., et al. Is lithium neuroprotective? An updated mechanistic illustrated review // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2023. – Vol. 37, № 1. – P. 4–30. – DOI: 10.1111/fcp.12826.
54. Gold A.B., Herrmann N., Lanctôt K.L. Lithium and its neuroprotective and neurotrophic effects: potential treatment for post-ischemic stroke sequelae // *Curr. Drug Targets.* – 2011. – Vol. 12, № 2. – P. 243–255. – DOI: 10.2174/138945011794182764.
55. Guo F., Liu X., Cai H., Le W. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy // *Brain Pathol.* – 2018. – Vol. 28, №1. – P. 3-13. – DOI: 10.1111/bpa.12545.
56. Haj-Yasein N.N., Vindedal G.F., Eilert-Olsen M., Gundersen G.A., Skare Ø., Laake P., Klungland A., Thorén A.E., Burkhardt J.M., Ottersen O.P., Nagelhus E.A. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood–brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 17815–17820. – DOI: 10.1073/pnas.1110655108.

57. Halder S.K., Delorme-Walker V.D., Milner R. β 1 integrin is essential for blood–brain barrier integrity under stable and vascular remodelling conditions; effects differ with age // *Fluids Barriers CNS.* – 2023. – Vol. 20. – Article 52. – DOI: 10.1186/s12987-023-00453-0.
58. Hamano T., Enomoto S., Shirafuji N., Ikawa M., Yamamura O., Yen S.H., Nakamoto Y. Autophagy and Tau Protein // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 14. – Article 7475. – DOI: 10.3390/ijms22147475.
59. Hrvoj-Mihic B., Semendeferi K. Neurodevelopmental disorders of the prefrontal cortex in an evolutionary context // *Prog. Brain Res.* – 2019. – Vol. 250. – P. 109–127. – DOI: 10.1016/bs.pbr.2019.05.003.
60. Hu Y., Zheng Y., Wang T., Jiao L., Luo Y. VEGF, a Key Factor for Blood Brain Barrier Injury After Cerebral Ischemic Stroke // *Aging and disease.* – 2022. – Vol. 13, №3. – P. 647–654. – DOI: 10.14336/AD.2021.1121.
61. Jena L., McErlean E., McCarthy H. Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2020. – Vol. 10, № 2. – P. 304–318. – DOI: 10.1007/s13346-019-00679-2.
62. Jia B., Xue Y., Yan X., Li J., Wu Y., Guo R., Zhang J., Zhang L., Li Y., Liu Y., Sun L. Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 16, № 3. – P. 3509–3516. – DOI: 10.3892/ol.2018.9131.
63. Jin S.M., Youle R.J. PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance // *J. Cell Sci.* – 2012. – Vol. 125, Pt 4. – P. 795–799. – DOI: 10.1242/jcs.093849.
64. Jope R.S., Nemeroff C.B. Lithium to the Rescue // *Cerebrum.* – 2016. – 2016:cer-02-16.
65. Joshi H.P., Subramanian I.V., Schnettler E.K., Ghosh G., Rupaimoole R., Evans C., Saluja M., Jing Y., Cristina I., Roy S., Zeng Y., Shah V.H., Sood A.K., Ramakrishnan S. Dynamin 2 along with microRNA-199a reciprocally regulate hypoxia-inducible factors and ovarian cancer metastasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111, № 14. – P. 5331–5336. – DOI: 10.1073/pnas.1317242111.

66. Jung S.R., Park S.Y., Koh J.H., Kim J.Y. Lithium enhances exercise-induced glycogen breakdown and insulin-induced AKT activation to facilitate glucose uptake in rodent skeletal muscle // *Pflugers Arch.* – 2021. – Vol. 473, № 4. – P. 673–682. – DOI: 10.1007/s00424-021-02543-0.
67. Jurga A.M., Paleczna M., Kadluczka J., Kuter K.Z. Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11, № 9. – Article 1361. – DOI: 10.3390/biom11091361.
68. Kadry H., Noorani B., Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity // *Fluids Barriers CNS.* – 2020. Vol. 17, №1. 69. – DOI: 10.1186/s12987-020-00230-3.
69. Kakhki S., Ahmadi-Soleimani S.M. Experimental data on lithium salts: From neuroprotection to multi-organ complications // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 306. – Article 120811. – DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120811.
70. Kast R.E. How lithium treatment generates neutrophilia by enhancing phosphorylation of GSK-3, increasing HIF-1 levels and how this path is important during engraftment // *Bone Marrow Transplant.* – 2008. – Vol. 41, № 1. – P. 23–26. – DOI: 10.1038/sj.bmt.1705872.
71. Ke P.Y. Molecular Mechanism of Autophagosome-Lysosome Fusion in Mammalian Cells // *Cells.* – 2024. – Vol. 13, № 6. – Article 500. – DOI: 10.3390/cells13060500.
72. Kerr F., Bjedov I., Sofola-Adesakin O. Molecular Mechanisms of Lithium Action: Switching the Light on Multiple Targets for Dementia Using Animal Models // *Front. Mol. Neurosci.* – 2018. – Vol. 11. – Article 297. – DOI: 10.3389/fnmol.2018.00297.
73. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) // *Autophagy.* – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 1–222. – DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.
74. Kolomeets N.S., Uranova N.A. Reduced number of satellite oligodendrocytes of pyramidal neurons in layer 5 of the prefrontal cortex in schizophrenia //

Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. – 2022. – Vol. 272, № 6. – P. 947–955. – DOI: 10.1007/s00406-021-01353-w.

75. Kurgan N., Whitley K.C., Maddalena L.A., Moradi F., Stoikos J., Hamstra S.I., Rubie E.A., Kumar M., Roy B.D., Woodgett J.R., Stuart J.A., Fajardo V.A. A low-therapeutic dose of lithium inhibits GSK3 and enhances myoblast fusion in C2C12 cells // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, № 11. – Article 1340. – DOI: 10.3390/cells8111340.

76. Kutuzov N., Flyvbjerg H., Lauritzen M. Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood–brain barrier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2018. – Vol. 115, № 38. – P. E9429–E9438. – DOI: 10.1073/pnas.1802155115.

77. Lan Y.L., Wang X., Lou J.C., Ma X.C., Zhang B. The potential roles of aquaporin 4 in malignant gliomas // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 32345–32355. – DOI: 10.18632/oncotarget.16017.

78. Lebeña A., Vegas O., Gómez-Lázaro E., Arregi A., Garmendia L., Beitia G., Azpiroz A. Melanoma tumors alter proinflammatory cytokine production and monoamine brain function, and induce depressive-like behavior in male mice // *Behavioural brain research*. – 2014. – Vol. 272. – P. 83–92. – DOI: 10.1016/j.bbr.2014.06.045.

79. Lee Y., Ju X., Cui J., Zhang T., Hong B., Kim Y.H., Ko Y., Park J., Choi C.H., Heo J.Y., Chung W. Mitochondrial dysfunction precedes hippocampal IL-1 β transcription and cognitive impairments after low-dose lipopolysaccharide injection in aged mice // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10, №7. – e28974. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e28974.

80. Lewandowsky M. Zur Lehre der Zerebrospinalflussigkeit // *Z. Klin. Med.* – 1900. – Vol. 40. – P. 480–484.

81. Li Q., Li H., Roughton K., et al. Lithium reduces apoptosis and autophagy after neonatal hypoxia-ischemia // *Cell Death Dis.* – 2010. – Vol. 1, № 7. – Article e56. – DOI: 10.1038/cddis.2010.33.

82. Li Y., Chen Y. AMPK and Autophagy // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1206. – P. 85–108.
83. Li Y., Wang Y., Huang X., Zhang H., Guan Y., Zhang X. Role of aquaporins in brain water transport and edema // *Frontiers in neuroscience.* – 2025. – Vol. 19. – 1518967. – DOI: 10.3389/fnins.2025.1518967.
84. Lin W., Xu G. Autophagy: A Role in the Apoptosis, Survival, Inflammation, and Development of the Retina // *Ophthalmic Res.* – 2018. – P. 1–8.
85. Liu Z.Y., Tang J.M., Yang M.Q., Yang Z.H., Xia J.Z. The role of LncRNA-mediated autophagy in cancer progression // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2024. – Vol. 12. – Article 1348894. – DOI: 10.3389/fcell.2024.1348894.
86. Lim S.H.Y., Hansen M., Kumsta C. Molecular Mechanisms of Autophagy Decline during Aging // *Cells.* – 2024. – Vol. 13, № 16. – Article 1364. – DOI: 10.3390/cells13161364.
87. Loch A.A., Zanetti M.V., de Sousa R.T., Chaim T.M., Serpa M.H., Gattaz W.F., Teixeira A.L., Machado-Vieira R. Elevated neurotrophin-3 and neurotrophin 4/5 levels in unmedicated bipolar depression and the effects of lithium // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2015. – Vol. 56. – P. 243–246. – DOI: 10.1016/j.pnpbp.2014.09.014.
88. Luse S.A. Electron microscopic observations of the central nervous system // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1956. – Vol. 2, № 5. – P. 531–542. – DOI: 10.1083/jcb.2.5.531.
89. Madireddy S., Madireddy S. Therapeutic Interventions to Mitigate Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress-Induced Damage in Patients with Bipolar Disorder // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 3. – Article 1844. – DOI: 10.3390/ijms23031844.
90. Malhi G.S., Tanious M., Das P., Berk M. The science and practice of lithium therapy // *Aust. N. Z. J. Psychiatry.* – 2012. – Vol. 46, № 3. – P. 192–211. – DOI: 10.1177/0004867412437346.
91. Mallick R., Basak S., Chowdhury P., Bhowmik P., Das R.K., Banerjee

A., Paul S., Pathak S., Duttaroy A.K. Targeting Cytokine-Mediated Inflammation in Brain Disorders: Developing New Treatment Strategies // *Pharmaceuticals* (Basel). – 2025. – Vol. 18, № 1. – P. 104. – DOI: 10.3390/ph18010104.

92. Manchia M., Paribello P., Pinna M., et al. Lithium and its effects: does dose matter? // *Int. J. Bipolar Disord.* – 2024. – Vol. 12, № 1. – Article 23. – DOI: 10.1186/s40345-024-00345-8.

93. Masson J.D., Blanchet B., Periou B., Authier F.J., Mograbi B., Gherardi R.K., Crépeaux G. Long Term Pharmacological Perturbation of Autophagy in Mice: Are HCQ Injections a Relevant Choice? // *Biomedicines*. – 2020. – Vol. 8, №3. – 47. – DOI: 10.3390/biomedicines8030047.

94. Mateus D., Marini E.S., Progida C., Bakke O. Rab7a modulates ER stress and ER morphology // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* – 2018. – Vol. 1865, № 5. – P. 781–793. – DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.011.

95. Mauthe M., Orhon I., Rocchi C., Zhou X., Luhr M., Hijlkema K.J., Coppes R.P., Engedal N., Mari M., Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion // *Autophagy*. – 2018. – Vol. 14, № 8. – P. 1435–1455. – DOI: 10.1080/15548627.2018.1474314.

96. Meng F., Xi Y., Huang J., et al. A curated diverse molecular database of blood-brain barrier permeability with chemical descriptors // *Sci. Data*. – 2021. – Vol. 8, № 1. – Article 289. – DOI: 10.1038/s41597-021-01069-5.

97. Mercer T.J., Gubas A., Tooze S.A. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293, № 15. – P. 5386–5395.

98. Messing A., Brenner M. GFAP at 50 // *ASN Neuro.* – 2020. – Vol. 12. – Article 1759091420949680. – DOI: 10.1177/1759091420949680.

99. Minami M. Drug delivery system to the brain and blood-brain barrier function // *Yakugaku Zasshi*. – 2001. – Vol. 121, № 12. – P. 875–885. – DOI: 10.1248/yakushi.121.875.

100. Mizushima N. The exponential growth of autophagy-related research:

from the humble yeast to the Nobel Prize // *FEBS Lett.* – 2017. – Vol. 591, № 5. – P. 681–689. – DOI: 10.1002/1873-3468.12594.

101. Motoi Y., Shimada K., Ishiguro K., Hattori N. Lithium and autophagy // *ACS Chem Neurosci.* – 2014. – Vol. 5, №6. – P. 434–442. – DOI:10.1021/cn500056q

102. Moreno-García A., Kun A., Calero O., Medina M., Calero M. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration // *Front. Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – Article 464. – DOI: 10.3389/fnins.2018.00464.

103. Morimura T., Numata Y., Nakamura S., Hirano E., Gotoh L., Goto Y.I., Urushitani M., Inoue K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2014. – Vol. 239, № 4. – P. 489–501. – DOI: 10.1177/1535370213520108.

104. Morris M.E., Rodriguez-Cruz V., Felmlee M.A. SLC and ABC transporters: expression, localization, and species differences at the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers // *AAPS J.* – 2017. – Vol. 19, № 5. – P. 1317–1331. – DOI: 10.1208/s12248-017-0110-8.

105. Motoi Y., Shimada K., Ishiguro K., Hattori N. Lithium and autophagy // *ACS Chem. Neurosci.* – 2014. – Vol. 5, № 6. – P. 434–442. – DOI: 10.1021/cn500056q.

106. Mujinya R., Owembabazi E., Usman I.M., Archibong V.B., Aja P.M., Mwandah D.C., Terkimbi S.D. Mechanisms of cancer-induced neurophysiological dysfunction and therapeutic strategies. *Discov. Oncol.* – 2025. – Vol. 16, №1. – 1678. – DOI: 10.1007/s12672-025-03520-0.

107. Munkholm K., Pedersen B.K., Kessing L.V., Vinberg M. Elevated levels of plasma brain derived neurotrophic factor in rapid cycling bipolar disorder patients // *Psychoneuroendocrinology.* – 2014. – Vol. 47. – P. 199–211. – DOI: 10.1016/j.psyneuen.2014.05.011.

108. Munz M., Bharioke A., Kosche G., Moreno-Juan V., Brignall A., Rodrigues T.M., Graff-Meyer A., Ulmer T., Haeuselmann S., Pavlinic D., Ledergerber

N., Gross-Scherf B., Rózsa B., Krol J., Picelli S., Cowan C.S., Roska B. Pyramidal neurons form active, transient, multilayered circuits perturbed by autism-associated mutations at the inception of neocortex // *Cell*. – 2023. – Vol. 186, № 9. – P. 1930–1949.e31. – DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.025.

109. Murawska-Ciałowicz E., Wiatr M., Ciałowicz M., et al. BDNF Impact on Biological Markers of Depression-Role of Physical Exercise and Training // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2021. – Vol. 18, № 14. – Article 7553. – DOI: 10.3390/ijerph18147553.

110. Nanavati D., Austin D.R., Catapano L.A., Luckenbaugh D.A., Dosemeci A., Manji H.K., Chen G., Markey S.P. The effects of chronic treatment with mood stabilizers on the rat hippocampal post-synaptic density proteome // *J. Neurochem*. – 2011. – Vol. 119, № 3. – P. 617–629. – DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07424.x.

111. Newman S. A., Pan Y., Short J. L., Nicolazzo J. A. Assessing the Impact of Lithium Chloride on the Expression of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier // *J. Pharm. Sci*. – 2017. – Vol. 106, №9. – P. 2625-2631. – DOI: 10.1016/j.xphs.2017.01.013.

112. Nguyen Y.T.K., Ha H.T.T., Nguyen T.H., Nguyen L.N. The role of SLC transporters for brain health and disease // *Cell. Mol. Life Sci*. – 2021. – Vol. 79, № 1. – Article 20. – DOI: 10.1007/s00018-021-04074-4.

113. Nielsen S.S.E., Holst M.R., Langthaler K., Christensen S.C., Bruun E.H., Brodin B., Nielsen M.S. Apicobasal transferrin receptor localization and trafficking in brain capillary endothelial cells // *Fluids Barriers CNS*. – 2023. – Vol. 20, № 1. – Article 2. – DOI: 10.1186/s12987-022-00404-1.

114. Nixon R.A., Rubinsztein D.C. Mechanisms of autophagy–lysosome dysfunction in neurodegenerative diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. – 2024. – Vol. 25. – P. 926–946. – DOI: 10.1038/s41580-024-00757-5.

115. Notaras M., van den Buuse M. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation // *Neuroscientist*. – 2019. – Vol. 25, № 5. – P. 434–454. – DOI: 10.1177/1073858418810142.

116. Obanina N.A., Bgatova N.P., Ivanov I.D. Neurons Structure and Cytokine Expression after Lithium Carbonate Treatment on Melanoma Mice Model // *Cell and Tissue Biology*. – 2024. – Vol. 18, № 5. – P. 549–560. – DOI: 10.1134/S1990519X2470041X.

117. Oldendorf W.H. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection // *Am. J. Physiol.* – 1971. – Vol. 221, № 6. – P. 1629–1639. – DOI: 10.1152/ajplegacy.1971.221.6.1629.

118. Ong W.Y., Go M.L., Wang D.Y., Cheah I.K., Halliwell B. Effects of antimalarial drugs on neuroinflammation-potential use for treatment of COVID-19-related neurologic complications // *Mol. Neurobiol.* – 2021. – Vol. 58, № 1. – P. 106–117. – DOI: 10.1007/s12035-020-02093-z.

119. Overwijk W.W., Restifo N.P. B16 as a mouse model for human melanoma // *Curr. Protoc. Immunol.* – 2001. – Chapter 20. – Unit 20.1. – DOI: 10.1002/0471142735.im2001s39.

120. Pan Y., Short J.L., Newman S.A., Choy K.H.C., Tiwari D., Yap C., Senyschyn D., Banks W.A., Nicolazzo J.A. Cognitive benefits of lithium chloride in APP/PS1 mice are associated with enhanced brain clearance of β -amyloid // *Brain Behav. Immun.* – 2018. – Vol. 70. – P. 36-47. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.03.007.

121. Papadopoulos M.C., Verkman A.S. Aquaporin-4 and brain edema // *Pediatr. Nephrol.* – 2007. – Vol. 22. – P. 778–784. – DOI: 10.1007/s00467-006-0411-0.

122. Parthasarathy L.K., Seelan R.S., Wilson M.A., Vadnal R.E., Parthasarathy R.N. Regional changes in rat brain inositol monophosphatase 1 (IM-Pase 1) activity with chronic lithium treatment // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. – 2003. – Vol. 27, № 1. – P. 55–60. – DOI: 10.1016/s0278-5846(02)00315-9.

123. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 460–473. – DOI: 10.1089/ars.2013.5371.

124. Pedrioli G., Patani R., Paganetti P. Chloroquine, the coronavirus crisis, and neurodegeneration: a perspective // *Front. Neurol.* – 2020. – Vol. 11. – Article 596528. – DOI: 10.3389/fneur.2020.596528.

125. Piguel N.H., Yoon S., Gao R., et al. Lithium rescues dendritic abnormalities in Ank3 deficiency models through the synergic effects of GSK3 β and cyclic AMP signaling pathways // *Neuropsychopharmacology*. – 2023. – Vol. 48, № 5. – P. 1000–1010. – DOI: 10.1038/s41386-022-01502-2.

126. Pitman A., Suleman S., Hyde N., Hodgkiss A. Depression and anxiety in patients with cancer // *BMJ (Clin. Res. Ed.)*. – 2018. – Vol. 361. – Article k1415. – DOI: 10.1136/bmj.k1415.

127. Prieto G.A., Cotman C.W. Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2017. – Vol. 34. – P. 27–33. – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.005.

128. Puglisi-Allegra S., Lazzeri G., Busceti C.L., Giorgi F.S., Biagioni F., Fornai F. Lithium engages autophagy for neuroprotection and neuroplasticity: Translational evidence for therapy // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2023. Vol. 148. – 105148. – DOI: 10.1016/j.neubiorev.2023.105148.

129. Ramaswamy B., Kulkarni S.D., Villar P.S., Smith R.S., Eberly C., Araneda R.C., Depireux D.A., Shapiro B. Movement of magnetic nanoparticles in brain tissue: mechanisms and impact on normal neuronal function // *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 11, № 7. – P. 1821–1829. – DOI: 10.1016/j.nano.2015.06.003.

130. Redondo P., Lloret P., Idoate M., Inoges S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression // *Clinical and experimental dermatology*. – 2005. – Vol. 30, №5. – P. 541–545. – DOI: 10.1111/j.1365-2230.2005.01849.x.

131. Reese T.S., Karnovsky M.J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase // *J. Cell Biol.* – 1967. – Vol. 34, № 1. – P. 207–217. – DOI: 10.1083/jcb.34.1.207.

132. Reed M.J., Damodarasamy M., Banks W.A. The extracellular matrix of the blood-brain barrier: structural and functional roles in health, aging, and Alzheimer's disease // *Tissue Barriers*. – 2019. – Vol. 7, № 4. – Article 1651157. – DOI: 10.1080/21688370.2019.1651157.

133. Ridley H. The anatomy of the brain. – London: Printers to the Royal Society, 1695. – p.40.

134. Riobó N.A., Clementi E., Melani M., Boveris A., Cadenas E., Moncada S., Poderoso J.J. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation // *The Biochemical journal*. – 2001. – Vol. 359(Pt 1). – P. 139–145. – DOI: 10.1042/0264-6021:3590139.

135. Rius-Pérez S., Torres-Cuevas I., Millán I., Ortega Á.L., Pérez S. PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2020. – 1452696. – DOI: 10.1155/2020/1452696.

136. Ruffoli R., Bartalucci A., Frati A., Fornai F. Ultrastructural studies of ALS mitochondria connect altered function and permeability with defects of mitophagy and mitochondriogenesis // *Front. Cell Neurosci*. – 2015. – Vol. 9. – Article 341. – DOI: 10.3389/fncel.2015.00341.

137. Saberian C., Sperduto P., Davies M.A. Targeted therapy strategies for melanoma brain metastasis // *Neuro-oncol. Adv*. – 2021. – Vol. 3, Suppl 5. – P. v75–v85. – DOI: 10.1093/noajnl/vdab131.

138. Santos J.C., Pyter L.M. Neuroimmunology of behavioral comorbidities associated with cancer and cancer treatments // *Front. Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – Article 1195. – DOI: 10.3389/fimmu.2018.01195.

139. Sarkar S., Floto R.A., Berger Z., Imarisio S., Cordenier A., Pasco M., Cook L.J., Rubinsztein D.C. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase // *J. Cell Biol*. – 2005. – Vol. 170, № 7. – P. 1101–1111. – DOI: 10.1083/jcb.200504035.

140. Sarkar S., Krishna G., Imarisio S., Saiki S., O'Kane C.J., Rubinsztein

D.C. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – Vol. 17, № 2. – P. 170–178. – DOI: 10.1093/hmg/ddm294.

141. Schagen S.B., Klein M., Reijneveld J.C., Brain E., Deprez S., Joly F., Scherwath A., Schrauwen W., Wefel J. S. Monitoring and optimising cognitive function in cancer patients: Present knowledge and future directions // *EJC Suppl.* – 2014. Vol. 12, №1. – P. 29-40. – DOI: 10.1016/j.ejcsup.2014.03.003.

142. Schimmel S.J., Acosta S., Lozano D. Neuroinflammation in traumatic brain injury: A chronic response to an acute injury // *Brain Circ.* – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 135–142. – DOI: 10.4103/bc.bc_18_17.

143. Schrepf A., Lutgendorf S.K., Pyter L.M. Pre-treatment effects of peripheral tumors on brain and behavior: neuroinflammatory mechanisms in humans and rodents // *Brain Behav. Immun.* – 2015. – Vol. 49. – P. 1–17. – DOI: 10.1016/j.bbi.2015.04.010.

144. Scrivo A., Bourdenx M., Pampliega O., Cuervo A.M. Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders // *Lancet Neurol.* – 2018. – Vol. 17, № 9. – P. 802–815. – DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30238-2.

145. Senft D., Ronai Z.A. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response // *Trends in biochemical sciences.* – 2015. – Vol. 40, №3. – P. 141–148. – DOI: 10.1016/j.tibs.2015.01.002.

146. Shen K., Song W., Wang H., Wang L., Yang Y., Hu Q., Ren M., Gao Z., Wang Q., Zheng S., Zhu M., Yang Y., Zhang Y., Wei C., Gu J. Decoding the metastatic potential and optimal postoperative adjuvant therapy of melanoma based on metastasis score // *Cell death discovery.* – 2023. – Vol. 9, №1. P. 397. – DOI: 10.1038/s41420-023-01678-6.

147. Shi M., Chai Y., Zhang J., Chen X. Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Neuronal Death and Innate Immune Response in Neurological Diseases // *Frontiers in immunology.* – 2022. – Vol. 12. – 794580. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.794580.

148. Shoshan-Barmatz V., Nahon-Crystal E., Shteinifer-Kuzmine A., Gupta R. VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease // *Pharmacol. Res.* – 2018. – Vol. 131. – P. 87–101. – DOI: 10.1016/j.phrs.2018.03.010.
149. Singh A., Arora S., Chavan M., Shahbaz S., Jabeen H. An overview of the neurotrophic and neuroprotective properties of the psychoactive drug lithium as an autophagy modulator in neurodegenerative conditions // *Cureus.* – 2023. – Vol. 15, № 8. – Article e44051. – DOI: 10.7759/cureus.44051.
150. Singh S., Xiao Z., Bavisi K., Roszik J., Melendez B.D., Wang Z., Cantwell M.J., Davis R.E., Lizee G., Hwu P., Neelapu S.S., Overwijk W.W., Singh M. IL-1 α Mediates Innate and Acquired Resistance to Immunotherapy in Melanoma // *J. Immunol.* – 2021. – Vol. 206, №8. – P. 1966-1975. – DOI: 10.4049/jimmunol.2000523.
151. Siveen K.S., Kuttan G. Inhibition of B16F-10 melanoma-induced lung metastasis in C57BL/6 mice by *Aerva lanata* via induction of apoptosis // *Integrative cancer therapies.* – 2013. – Vol. 12, №1. – P. 81–92. – DOI: 10.1177/1534735412443853.
152. Song S.B., Shim W., Hwang E.S. Lipofuscin granule accumulation requires autophagy activation // *Exp. Mol. Med.* – 2023. – Vol. 55, № 7. – Article 633112. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.07.059.
153. Sporbeck K., Odendall F., Proikas-Cezanne T. Interconnected regulation of apoptosis and WIPI-mediated autophagy // *InTech.* – 2015. – DOI: 10.5772/62056.
154. Stacchiotti A., Favero G., Lavazza A., Garcia-Gomez R., Monsalve M., Rezzani R. Perspective: mitochondria-ER contacts in metabolic cellular stress assessed by microscopy // *Cells.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – Article 5. – DOI: 10.3390/cells8010005.
155. Stribbling S.M., Ryan A.J. The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research // *Nature protocols.* – 2022. – Vol. 17, №9. – P. 2108–2128. – DOI: 10.1038/s41596-022-00709-3.

156. Sweeney M.D., Zhao Z., Montagne A., Nelson A.R., Zlokovic B.V. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back // *Physiol. Rev.* – 2019. – Vol. 99, № 1. – P. 21–78. – DOI: 10.1152.
157. Szałach Ł.P., Lisowska K.A., Cubała W.J., Barbuti M., Perugi G. The immunomodulatory effect of lithium as a mechanism of action in bipolar disorder // *Front. Neurosci.* – 2023. – Vol. 17. – Article 1213766. – DOI: 10.3389/fnins.2023.1213766.
158. Takata F., Nakagawa S., Matsumoto J., Dohgu S. Blood-brain barrier dysfunction amplifies the development of neuroinflammation: understanding of cellular events in brain microvascular endothelial cells for prevention and treatment of BBB dysfunction // *Front. Cell. Neurosci.* – 2021. – Vol. 15. – Article 661838. – DOI: 10.3389/fncel.2021.661838.
159. Takei H., Takanashi S., Otomo K., Hanaoka H., Kikuchi J., Yamaoka K., Yoshimoto K., Abe T., Takeuchi T., Kaneko Y. Clinical and immunological effects of hydroxychloroquine in patients with active rheumatoid arthritis despite antirheumatic treatment // *Mod. Rheumatol.* – 2023. – Vol. 34, № 1. – P. 50–59. – DOI: 10.1093/mr/roac153.
160. Taskaeva I., Gogaeva I., Shatruck A., Bgatova N. Lithium Enhances Autophagy and Cell Death in Skin Melanoma: An Ultrastructural and Immunohistochemical Study // *Microsc. Microanal.* – 2022. – DOI: 10.1017/S1431927622000745.
161. Taskaeva I., Kasatova A., Surodin D., Bgatova N., Taskaev S. Study of Lithium Biodistribution and Nephrotoxicity in Skin Melanoma Mice Model: The First Step towards Implementing Lithium Neutron Capture Therapy // *Life (Basel)*. – 2023. – Vol. 13, №2. – 518. – DOI: 10.3390/life13020518.
162. Taskaeva I., Shatruck A., Ivanov I., Bgatova N. The effects of autophagy-modifying drugs chloroquine and lithium on the skin melanoma microenvironment // *Tissue Cell.* – 2025. – Vol. 93. – 102753. DOI: 10.1016/j.tice.2025.102753.
163. Teixido C., Castillo P., Martinez-Vila C., Arance A., Alos L. Molecular markers and targets in melanoma // *Cells.* – 2021. – Vol. 10, № 9. – Article 2320. – DOI: 10.3390/cells10092320.

164. Thal D.R., Gawor K., Moonen S. Regulated cell death and its role in Alzheimer's disease and amyotrophic lateralsclerosis // *Acta Neuropathol.* – 2024. – Vol. 147, № 1. – P. 69. – DOI: 10.1007/s00401-024-02722-0.

165. Thrane A.S., Rappold P.M., Fujita T., Torres A., Bekar L.K., Takano T., Peng W., Wang F., Rangroo Thrane V., Enger R., Haj-Yasein N.N., Skare Ø., Holen T., Klungland A., Ottersen O.P., Nedergaard M., Nagelhus E.A. Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca^{2+} signaling events elicited by cerebral edema // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 846–851. – DOI: 10.1073/pnas.1015217108.

166. Tian A.L., Wu Q., Liu P., Zhao L., Martins I., Kepp O., Leduc M., Kroemer G. Lysosomotropic agents including azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine activate the integrated stress response // *Cell Death Dis.* – 2021. – Vol. 12, № 1. – Article 6. – DOI: 10.1038/s41419-020-03324-w.

167. Turner R.J., Sharp F.R. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke // *Frontiers in cellular neuroscience.* – 2016. – Vol. 10. – P. 56. – DOI: 10.3389/fncel.2016.00056.

168. Valvassori S.S., Resende W.R., Dal-Pont G. et al. Lithium ameliorates sleep deprivation-induced mania-like behavior, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, oxidative stress and elevations of cytokine concentrations in the brain and serum of mice // *Bipolar Disord.* – 2017. – Vol. 19, № 4. – P. 246–258. – DOI: 10.1111/bdi.12503.

169. van Horssen J., van Schaik P., Witte M. Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? // *Neuroscience letters.* – 2019. – Vol. 710. – 132931. – DOI: 10.1016/j.neulet.2017.06.050.

170. Vandebroek A., Yasui M. Regulation of AQP4 in the central nervous system // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 5. – Article 1603. – DOI: 10.3390/ijms21051603.

171. Versele R., Sevin E., Gosselet F., Fenart L., Candela P. $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ Modulate Blood-Brain Barrier Permeability and Decrease Amyloid- β Peptide

Efflux in a Human Blood-Brain Barrier Model // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. Vol. 23, №18. – 10235. – DOI: 10.3390/ijms231810235.

172. Villabona-Rueda A., Erice C., Pardo C.A., Stins M.F. The evolving concept of the blood brain barrier (BBB): from a single static barrier to a heterogeneous and dynamic relay center // *Front. Cell. Neurosci.* – 2019. – Vol. 13. – Article 405. – DOI: 10.3389/fncel.2019.00405.

173. Villegas-Vázquez E.Y., Quintas-Granados L.I., Cortés H. et al. Lithium: a promising anticancer agent // *Life (Basel)*. – 2023. – Vol. 13, № 2. – Article 537. – DOI: 10.3390/life13020537.

174. Vulturar R., Chiş A., Pintilie S., Farcaş I.M., Botezatu A., Login C.C., Sitar-Taut A.V., Orasan O.H., Stan A., Lazea C., Al-Khzouz C., Mager M., Vinţan M.A., Manole S., Damian L. One molecule for mental nourishment and more: glucose transporter type 1-biology and deficiency syndrome // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, № 6. – Article 1249. – DOI: 10.3390/biomedicines10061249.

175. Wang L., Liu Y., Zhang X. et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cerebral ischemia/reperfusion injury // *Front. Cell. Neurosci.* – 2022. – Vol. 16. – Article 864426. – DOI: 10.3389/fncel.2022.864426.

176. Wang Q., Xue H., Yue Y., Hao S., Huang S.H., Zhang Z. Role of mitophagy in the neurodegenerative diseases and its pharmacological advances: A review // *Front. Mol. Neurosci.* – 2022. Vol. 15. – Article 1014251. – DOI: 10.3389/fnmol.2022.1014251.

177. Wolburg H., Noell S., Fallier-Becker P., Mack A.F., Wolburg-Buchholz K. The disturbed blood–brain barrier in human glioblastoma // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – Vol. 33. – P. 579–589. – DOI: 10.1016/j.mam.2012.02.003.

178. Wu D., Chen Q., Chen X. et al. The blood–brain barrier: structure, regulation and drug delivery // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2023. – Vol. 8. – Article 217. – DOI: 10.1038/s41392-023-01481-w.

179. Wu F., Tian F.-J., Lin Y. Oxidative stress in placenta: health and diseases // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Article ID 914864. – P. 1–15.

180. Xu P. The medial prefrontal cortex in neurological diseases // *Physiol. Genomics*. – 2019. – Vol. 51, № 9. – P. 636–648. – DOI: 10.1152/physiolgenomics.00006.2019.

181. Xu P., Chen A., Li Y., Xing X., Lu H. Medial prefrontal cortex in neurological diseases // *Physiol. Genomics*. – 2019. – Vol. 51, №9. – pp. 432-442. – DOI: 10.1152/physiolgenomics.00006.2019.

182. Xu H., Zhang Y., Wang L., Wang J. Hydroxychloroquine increased anxiety-like behaviors and decreased the mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala of mice // *Front. Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – Article 633112. – DOI: 10.3389/fphar.2021.633112.

183. Yang S., Chu S., Gao Y., Ai Q., Liu Y., Li X., Chen N. A Narrative Review of Cancer-Related Fatigue (CRF) and Its Possible Pathogenesis // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, №7. – 738. – DOI: 10.3390/cells8070738.

184. Yang Y., Rosenberg G.A. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42, № 11. – P. 3323–3328. – DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.608257.

185. Young W. Review of lithium effects on brain and blood // *Cell Transplant.* – 2009. – Vol. 18, № 9. – P. 951–975. – DOI: 10.3727/096368909X471251.

186. Yim W.W., Mizushima N. Lysosome biology in autophagy // *Cell Discov.* – 2020. – Vol. 6. – Article 6. – DOI: 10.1038/s41421-020-0141-7.

187. Zaragozá R. Transport of amino acids across the blood-brain barrier // *Front. Physiol.* – 2020. – Vol. 11. – Article 973. – DOI: 10.3389/fphys.2020.00973.

188. Zelada D., Barrantes F.J., Henríquez J.P. Lithium causes differential effects on postsynaptic stability in normal and denervated neuromuscular synapses // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – Article 17285. – DOI: 10.1038/s41598-021-96708-7.

189. Zhang D., Wang F., Zhai X., Li X.-H., He X.-J. Lithium promotes recovery of neurological function after spinal cord injury by inducing autophagy // *Neural Regen. Res.* – 2018. – Vol. 13, № 12. – P. 2191–2199. – DOI: 10.4103/1673-5374.241473.

190. Zhang J., Wang X., Zhang J. Inhibition of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2017. – Vol. 37, № 3. – P. 1155–1167. – DOI: 10.1177/0271678X17736715.

191. Zhang L., Ren F., Zhang Q., Wang L., Liu J. The role of lithium in the treatment of neurodegenerative diseases: from mechanism to clinical applications // Front. Mol. Neurosci. – 2023. – Vol. 16. – Article 1099727. – DOI: 10.3389/fnmol.2023.1099727.

192. Zhao Z., Nelson A.R., Betsholtz C., Zlokovic B.V. Establishment and dysfunction of the blood–brain barrier // Cell. – 2015. – Vol. 163. – P. 1064–1078. – DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.067.

193. Zhou J., Tan S., Ding K., Yuan L., Sun Y., Hu H., Zhang Y., Chen L., Ma W. Inhibition of autophagy by lithium chloride enhances cytotoxicity of cisplatin in human cervical cancer cells // Cancer Sci. – 2017. – Vol. 108, № 12. – P. 2477–2485. – DOI: 10.1111/cas.13406.