

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Бгатова Наталия Петровна

Официальные оппоненты:

Айдагулова Светлана Владимировна, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ЦНИЛ.

Жданкина Анна Александровна, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии (г. Томск).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2026 г. в _____ час. на заседании диссертационного совета 24.1.242.03 в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», <http://frcftm.ru>

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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 ГЭБ 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 ГЭБ, 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. Карбонат 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 ГЭБ 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 ГЭБ 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 опушенных 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 ГЭБ префронтальной коры при моделировании меланомы кожи. Выявлены структурные признаки повышения проницаемости ГЭБ, связанные с увеличением экспрессии AQP4 и повышением 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 ГЭБ 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 ГЭБ в условиях моделирования меланомы кожи и применении 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

ГЭБ. 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 результатов 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 ГЭБ 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.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора научной литературы, описания материала и методов исследований, глав с результатами собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, содержащего 193 источника. Работа изложена на 116 страницах, содержит 26 рисунков, 5 таблиц.

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.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 международными нормами гуманного обращения с лабораторными жи-

вотными 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/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.

Иммуногистохимическое окрашивание и световая микроскопия. Для выполнения световой микроскопии фрагменты префронтальной коры фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обезжизняли 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).

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 инкубировали 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).

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 OsO_4 в фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$), 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.

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 $\times 30\,000$ 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: $\text{CTCF} = \text{IntDen} - (\text{Area} \times \text{Mean_background})$, где IntDen – интегрированная плотность (суммарная интенсивность) сигнала в клетке, Area – площадь клетки (в пикселях), Mean_background – средняя интенсивность фонового сигнала.

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 опи-

сание 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 $p < 0,05$.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Ультраструктура пирамидных нейронов префронтальной коры при моделировании меланомы кожи. При анализе ультраструктуры пирамидных нейронов префронтальной коры животных группы Опухоль наблюдали митохондрии с деструктивными изменениями крист. Их объемная плотность была увеличена в 3 раза ($p < 0,0001$), что составляло 48,1% от общего числа митохондрий (табл. 1). В группе Опухоль часто отмечали расширение просвета цистерн ЭПР ($p = 0,0025$).

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

Параметры (V _v , %)	Группа					
	Контроль	Контроль + Li	Контроль + CQ	Опухоль	Опухоль + Li	Опухоль + CQ
Митохондрии	6,36 (5,47; 8,19)	7,30 (5,08; 8,70)	8,44 (7,47; 11,64)*	4,53* (2,58; 6,56)	8,90 ^{##} (5,73; 9,65)	6,08 (4,09; 7,20)
Митохондрии с деструктивными изменениями	1,20 (0,00; 1,98)	0***	0,50* (0; 2,54)	4,19*** (2,90; 6,08)	0,93 ^{##} (0,36; 2,00)	4,16*** (1,80; 5,92)
ЭПР	4,47 (3,99; 5,36)	5,63* (4,30; 6,96)	4,73 (3,87; 5,66)	3,15* (2,11; 4,80)	4,10 (3,71; 5,77)	6,31*** ^{###} (4,56; 7,75)
ЭПР с расширен- ными цистернами	0,57 (0,27; 1,99)	0***	0*	3,25** (1,22; 5,70)	0*, ^{###} (0; 0,37)	0***, ^{###}
Полисомы	29,56 (22,50; 33,79)	27,15 (24,20; 29,64)	21,8*** (19,61; 25,08)	24,88 (19,28; 32,58)	34,08*, ^{##} (32,55; 39,31)	30,0 [#] (28,21; 32,23)
Транспортные везикулы	0,63 (0,33; 0,82)	0,07*** (0,04; 0,13)	0,33*** (0,23; 0,44)	0,53 (0,30; 0,70)	0,11***, ^{###} (0,09; 0,18)	0,21***, ^{###} (0,09; 0,30)
Клатриновые везикулы	0,21 (0,16; 0,39)	0,06*** (0,04; 0,15)	0,14** (0,10; 0,21)	0,24 (0,14; 0,31)	0,16 (0,09; 0,32)	0,10***, ^{##} (0,05; 0,16)
Липофусциновые тельца	0,15 (0; 0,54)	0 (0; 0,64)	0,39 (0; 1,03)	0,28 (0; 0,57)	0 (0; 0,47)	1,46**, [#] (0; 2,61)

Примечание: V_v – Объемная плотность (%) внутриклеточных органелл интактных животных (Контроль); контрольных животных, получавших карбонат лития (Контроль + Li); контрольных животных, получавших хлорохин (Контроль + CQ); животных с опухолью (Опухоль); животных с опухолью, получавших карбонат лития (Опухоль + Li); животных с опухолью, получавших хлорохин (Контроль + 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.

Полисомы играют важную роль в синтетической функции клетки. Объемная плотность свободных полисом в группе Опухоль снизилась на 15,8%. При сравнении объемной плотности свободных транспортных везикул и клатриновых везикул никаких существенных различий между контролем и группой Опухоль обнаружено не было.

Анализ содержания аутофагических структур: аутофагосом, аутолизосом, лизосом в соме пирамидных нейронов показал, что достоверных различий в объемной плотности аутофагических структур между группами не было. Однако в группе Опухоль отмечали достоверное преобладание аутофагосом, тогда как в группе Контроль преобладали лизосомы. Иммунофлуоресцентный анализ показал в группе Опухоль достоверное увеличение

в 2,2 раза интенсивности флуоресценции маркера аутофагосом LC3 β в префронтальной коре ($p < 0,0001$) (рис. 1).

При анализе структуры синапсов нейронов в группе Опухоль с помощью морфометрического анализа отмечали достоверное снижение объемной плотности синаптических везикул ($p < 0,0001$). С помощью иммунофлуоресцентного анализа оценивали интенсивность флуоресценции маркера синаптических везикул синаптофизина. Наблюдали трехкратное увеличение интенсивности флуоресценции синаптофизина в группе Опухоль ($p < 0,0001$) (рис. 2).

Таким образом, 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 LC3 β . При анализе структуры синапсов нейронов префронтальной коры в группе Опухоль отмечали снижение объемной плотности синаптических везикул, а также трехкратное увеличение экспрессии синаптофизина.

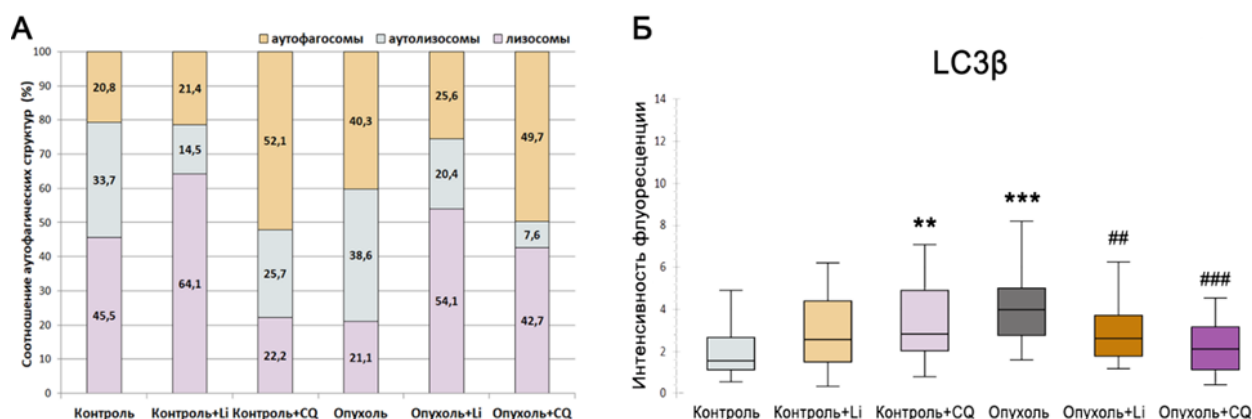


Рисунок 1. Результаты морфометрического и иммунофлуоресцентного анализа аутофагических структур пирамидных нейронов префронтальной коры при меланоме и применении лития карбоната и хлорохина. А – соотношение аутофагических структур в пирамидных нейронах. Б – интенсивность флуоресценции маркера LC3 β . ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

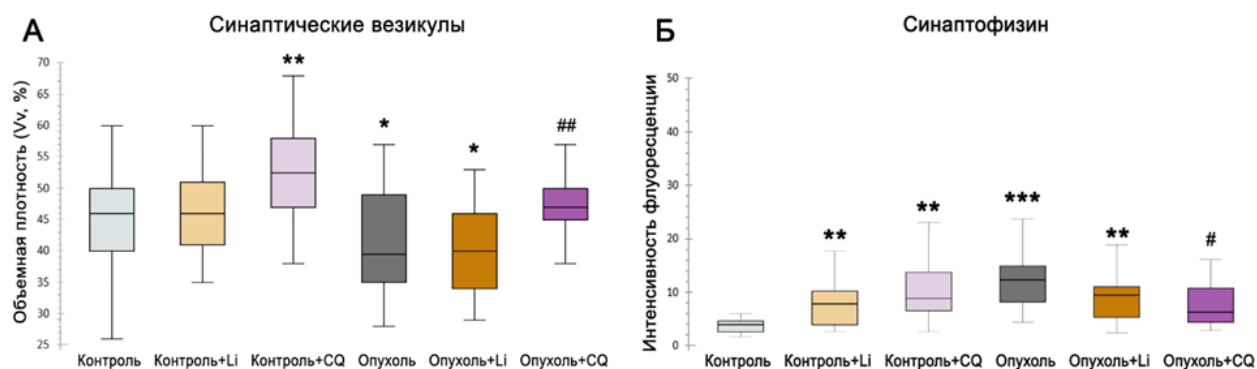


Рисунок 2. Морфометрический и иммунофлуоресцентный анализ синапсов префронтальной коры. А – объемная плотность синаптических везикул. Б – интенсивность флуоресценции синаптофизина в компонентах префронтальной коры. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$ по сравнению с группой Опухоль.

Структурная организация гематоэнцефалического барьера префронтальной коры при меланоме кожи. К компонентам ГЭБ 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, набухание эндотелиоцитов, наличие тромбоцитов в просвете сосудов. Кроме того, отмечали фрагментарное набухание базальной мембраны, ее разрыхление и выраженный перикапиллярный отёк.

Перикапиллярные ножки астроцитов являются неотъемлемой частью ГЭБ. 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. На препаратах префронтальной коры животных группы Опухоль отмечали значительное увеличение AQP4⁺-астроцитов на 56,5% ($p < 0.0001$) (рис. 3).

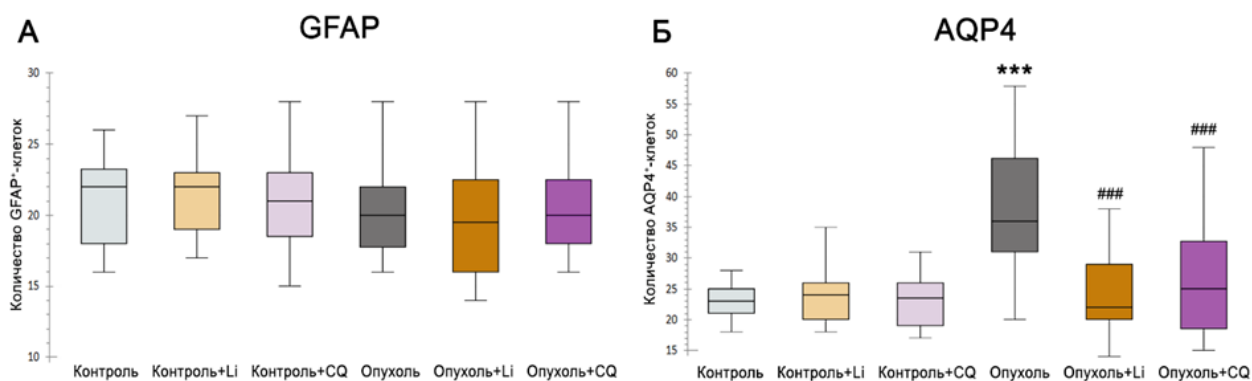


Рисунок 3. Результаты иммунофлуоресцентного анализа структур гематоэнцефалического барьера при меланоме и применении карбоната лития и хлорохина. Количество GFAP⁺- (А) и AQP4⁺-астроцитов (Б). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ по сравнению с группой Опухоль.

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 не изменялось. 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% возрастало число контактов типа конец в конец.

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 ($p = 0,0076$).

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

Параметры (V _v , %)	Группа					
	Контроль	Контроль + Li	Контроль + CQ	Опухоль	Опухоль + Li	Опухоль + CQ
Люминальные кавеолы	0,79 (0,27; 1,84)	0,90 (0; 1,40)	1,41 (0,64; 2,24)	0,62 (0,52; 1,19)	0,96 (0,59; 1,16)	0,79 (0,13; 1,28)
Базальные кавеолы	1,10 (0,58; 2,31)	1,04 (0,61; 1,62)	0,95 (0,31; 1,90)	1,12 (0,84; 2,17)	1,29 (0,43; 2,02)	0,75 (0; 1,73)
Транспортные везикулы	5,69 (3,32; 7,68)	4,90 (2,71; 8,57)	2,20* (1,39; 4,31)	8,94* (7,42; 10,76)	5,24 [#] (3,50; 7,96)	6,12 [#] (4,31; 7,46)
Клатриновые везикулы	0	0,14 (0; 0,48)	0 (0; 0,75)	0	0 [#] (0; 0,74)	0 (0; 0,13)
Полисомы	12,14 (7,55; 16,60)	8,86 (5,07; 15,06)	7,99 (5,16; 14,39)	7,23* (3,29; 11,58)	14,52 [#] (9,48; 16,12)	17,85 [#] (14,89; 20,62)
Митохондрии	4,62 (0; 7,97)	4,19 (0; 5,98)	0 (0; 10,03)	2,12 (0; 6,52)	1,98 (0; 13,14)	0 (0; 5,86)
ЭПР	0 (0; 1,82)	0 (0; 1,29)	1,90* (0,63; 2,78)	0 (0; 1,01)	0,81 (0; 1,40)	0 (0; 1,69)

Примечание: V_v – Объемная плотность (%) внутриклеточных органелл интактных животных (Контроль); контрольных животных, получавших карбонат лития (Контроль + Li); контрольных животных, получавших хлорохин (Контроль + CQ); животных с опухолью (Опухоль); животных с опухолью, получавших карбонат лития (Опухоль + Li); животных с опухолью, получавших хлорохин (Контроль + CQ). * p<0,05 по сравнению с контролем. [#] p<0,05 по сравнению с группой Опухоль.

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).

Таким образом, 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.

Ультраструктурная перестройка пирамидных нейронов при применении карбоната лития. В группе Контроль + Li в цитоплазме пирамидных нейронов префронтальной коры наблюдали достоверное снижение структурных нарушений митохондрий и ЭПР (p<0,0001). Кроме того, отмечали значительное снижение неопушенных и опушенных клатрином везикул на 88,9% и 71,4% соответственно (p<0,0001) (см. табл. 1). При анализе структуры синапсов в группе Контроль + Li отмечали увеличение количества синапсов на 21,2%, при этом 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. При этом 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 20,8% (p<0,0001) по сравнению с группой Опухоль (см. табл. 1).

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 LC3β сопоставимый с группой кон-

троля (см. рис. 1). Кроме того, в обеих группах отмечали увеличение интенсивности флуоресценции синаптофизина относительно группы контроля ($p < 0,005$) (см. рис. 2).

Таким образом, в пирамидных нейронах префронтальной коры применение лития как в опухолевых, так и безопухолевых условиях показало 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 LC3 β 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 не обнаружили, однако наблюдали увеличение экспрессии синаптофизина в сравнении с контролем.

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.3). Отмечали снижение толщины базальной мембраны. Достоверных различий в объемной плотности люминальных и базальных кавеол в эндотелиоцитах кровеносных капилляров префронтальной коры выявлено не было. Объемная плотность транспортных везикул не отличалась от соответствующей величины в контроле (см. табл. 2).

В группе Опухоль + Li количество AQP4-позитивных клеток снижалось относительно группы Опухоль и достигало уровня контрольной группы (рис. 3). Наблюдали достоверное увеличение толщины базальной мембраны. Не обнаружили достоверных различий в объемной плотности люминальных и базальных кавеол в эндотелиоцитах. Однако наблюдали восстановление транспортных везикул до уровня контроля. Кроме того, отмечали увеличение объемной плотности полисом в сравнении с группой Опухоль, что сопоставимо с контрольными значениями (см. табл. 2).

Таким образом, в группе Контроль + Li ультраструктурная организация эндотелиоцитов не отличалась от контроля. В группе Опухоль + Li применение карбоната лития способствовало нормализации показателей ГЭБ, 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.

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 ($p < 0,05$). Кроме того, наблюдали снижение объемной плотности полисом ($p < 0,0001$), следствием чего может быть снижение синтетической функции клетки. Отмечали снижение объемной плотности свободных транспортных везикул на 47,6% ($p < 0,0001$), клатриновых везикул на 33,3% ($p < 0,001$) (см. табл. 1).

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 60,4% и достоверное пятикратное повышение содержания липофусциновых телец (см. табл. 1).

В группе Опухоль + CQ наблюдали накопление аутофагосом и лизосом и снижение аутолизосом. Во всех группах с применением хлорохина при иммунофлуоресцентном анализе префронтальной коры отмечали значительное повышение экспрессии LC3 β в сравнении с группой контроля (см. рис. 1).

При анализе синапсов нейронов префронтальной коры было отмечено, что хлорохин как в группе Контроль + CQ, так и Опухоль + CQ способствовал повышению объ-

емной плотности синаптических везикул. В группе Опухоль + CQ наблюдали значительное увеличение количества синапсов в фрагментах префронтальной коры.

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 (см. рис. 2).

Таким образом, 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. 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.

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 (см. рис. 3). При определении толщины базальной мембраны обнаружено достоверное ее снижение. С помощью морфометрического анализа в эндотелиоцитах ГЭБ наблюдали достоверное снижение объемной плотности транспортных везикул ($p < 0,05$) см. (см. табл. 2). Достоверных различий в объемной плотности базальных и люминальных кавеол и митохондрий между исследуемыми группами не наблюдали.

В группе Опухоль + CQ наблюдали снижение количества AQP4-позитивных клеток до уровня контрольной группы см. см. (рис. 3). 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. 2). Показатели объемной плотности базальных и люминальных кавеол, ЭПР и митохондрий сопоставимы с контролем.

Таким образом, в группе Контроль + CQ при оценке структуры ГЭБ 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.

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. 4, А).

Иммуногистохимический анализ экспрессии маркера нейротрофического фактора головного мозга BDNF в срезах префронтальной коры показал, что в опухолевой группе площадь BDNF⁺-областей уменьшилась на 64% ($p < 0,00001$) (рис. 4, Б).

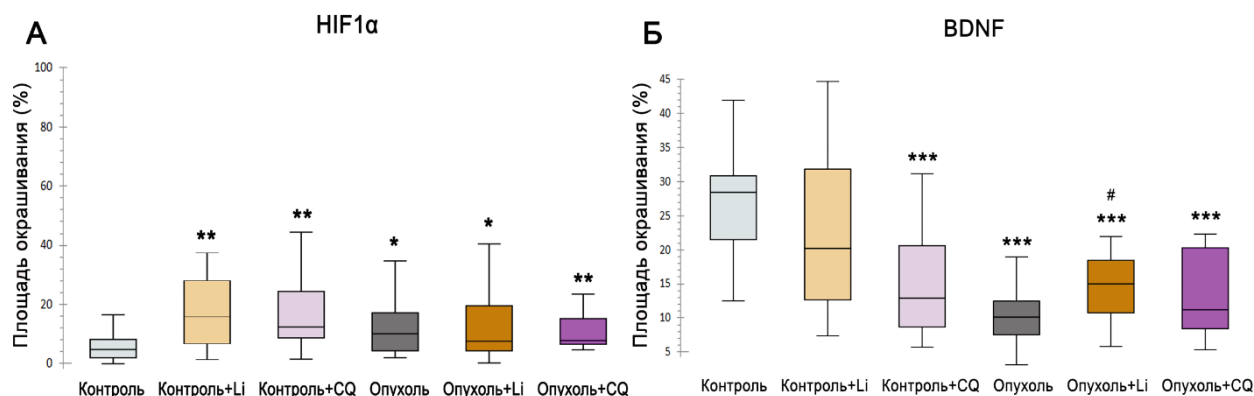


Рисунок 4. Экспрессия HIF1 α (А) и BDNF (Б) в префронтальной коре при меланоме и применении карбоната лития и хлорохина. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой Опухоль.

Таким образом, 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.

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 41,7% ($p < 0,005$). При оценке экспрессии нейротрофического фактора головного мозга BDNF не наблюдали достоверных различий с группой контроля (см. рис. 4).

В группе Опухоль + Li наблюдали преобладание ядерной формы HIF1 α , площади окрашивания повышалась в сравнении с контролем ($p < 0,05$). При оценке экспрессии BDNF отмечали увеличение площади BDNF⁺-участков на 50% ($p < 0,01$) по сравнению с группой Опухоль (см. рис. 4).

Таким образом, 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.

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 ($p < 0,0005$) (см. рис. 4).

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. 4). Площадь окрашивания BDNF была соизмерима с группой Опухоль.

Таким образом, 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 ГЭБ, 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 нейродегенеративное 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 повреждённых органелл, что указывает на нарушение процесса аутофагии. Введение карбоната лития способствует завершённости аутофагии, о чём свидетельствует восстановление баланса аутофагических структур и снижение объёмной 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 трансцитоз 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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 Молодёжной школы-конференции по молекулярной 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИЛ – интерлейкин

ЦНС – центральная нервная система

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

AQP4 – водный канал, аквапорин 4

BDNF – нейротрофический фактор мозга

CQ – хлорохин

GFAP – глиальный фибриллярный кислотный белок

HIF1 α — гипоксия-индуцированный фактор 1 альфа

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

Li – литий (карбонат лития)

Me – медиана

Vv – объемная плотность (%)

Соискатель

Н.А. Обанина