

## НАРУШЕНИЕ УРОВНЯ ТРАНСПОРТЕРОВ ЛАКТАТА В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ БЕТА-АМИЛОИДА *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2023 г. Я. В. Горина<sup>1, \*</sup>, Е. В. Харитоновна<sup>1</sup>, Е. Д. Хилажева<sup>1</sup>, А. А. Семенова<sup>1</sup>, А. В. Моргун<sup>2</sup>, Ю. К. Комлева<sup>1, 3</sup>, О. Л. Лопатина<sup>2</sup>, А. Б. Салмина<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ (КрасГМУ), Красноярск, 660022 Россия

<sup>2</sup>Кафедра поликлинической педиатрии и пропедевтики детских болезней с курсом ПО КрасГМУ, Красноярск, 660022 Россия

<sup>3</sup>Центр коллективного пользования Молекулярные и клеточные технологии, КрасГМУ, Красноярск, 660022 Россия

<sup>4</sup>Лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, 125367 Россия

\*E-mail: yana\_20@bk.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 22.09.2022 г.

Принята к публикации 07.10.2022 г.

Снижение энергетического метаболизма головного мозга коррелирует с когнитивными нарушениями при болезни Альцгеймера. Накапливающиеся экспериментальные данные указывают на то, что переносчики лактата и монокарбоксилатные транспортеры (МСТ) принимают непосредственное участие в церебральном энергетическом метаболизме. Однако в настоящее время изменения уровня лактата и МСТ при болезни Альцгеймера остаются неясными. Цель исследования заключалась в изучении содержания лактата и уровня его транспортеров МСТ1 и МСТ2 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы при остром токсическом действии бета-амилоида (A $\beta$ 1–42) *in vitro* и *in vivo*. Показано, что в условиях острого токсического действия A $\beta$ 1–42 *in vivo* значительно ( $P \leq 0.05$ ) уменьшается уровень лактата в ткани гиппокампа и повышается в диализате на фоне низкого уровня МСТ1 и МСТ2. *In vitro* выявлена высокая ( $P \leq 0.05$ ) продукция лактата астроцитами, сопряженная с низким ( $P \leq 0.05$ ) уровнем МСТ2 на нейронах. Таким образом, A $\beta$ 1–42 вызывает снижение уровня лактата в ткани гиппокампа и повышение его уровня в диализате *in vivo*, что коррелирует с нарушением уровня МСТ1 и МСТ2. Это указывает на нарушение энергетического метаболизма за счет острого токсического действия A $\beta$ 1–42. При этом выявленное повышение продукции лактата астроцитами *in vitro* может свидетельствовать о включении компенсаторного механизма, направленного на поддержание астроцитарно-нейронального взаимодействия.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, лактат, МСТ, энергетический метаболизм

**DOI:** 10.31857/S0041377123010042, **EDN:** GOTNXZ

Болезнь Альцгеймера (БА) – хроническое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся наличием клубков гиперфосфорилированного таубелка, отложением пептида бета-амилоида (A $\beta$ 1–42) и потерей нейронов (Forlenta et al., 2010). Характерной особенностью пациентов с БА является неспособность консолидировать долговременную память, что приводит к прогрессирующему ухудшению памяти по мере развития заболевания (Bondi et al., 2017).

**Принятые сокращения:** БА – болезнь Альцгеймера; ГЭБ – гемато-энцефалический барьер; МСТ – монокарбоксилатные транспортеры; A $\beta$ 1–42 – бета-амилоид; BSA – бычий сывороточный альбумин; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; NSE – нейрон-специфическая энолаза; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

Важно отметить, что энергетические потребности головного мозга очень высокие, и в этом контексте действуют жесткие регулирующие механизмы, обеспечивающие своевременную доставку необходимых энергетических субстратов в соответствии с активностью нейронов, для формирования и консолидации памяти (Falkowska et al., 2015; Shin et al., 2018). Ряд исследований убедительно продемонстрировали, что снижение энергетического метаболизма головного мозга может не только предшествовать, но и способствовать развитию БА с выраженным проявлением митохондриальной и когнитивной дисфункции (Mosconi et al., 2009; Croteau et al., 2018). Глюкоза является одним из ключевых компонентов сигнальных путей для поддержания функции нейронов.

При этом в условиях покоя астроциты потребляют больше всего глюкозы (около 85%) и выделяют лактат, в то время как нейроны вносят минимальный вклад в потребление этого субстрата в головном мозге (Bolaños et al., 2010).

Как показывают последние экспериментальные данные, нарушение церебрального метаболизма глюкозы, обусловленное снижением нейронального поглощения глюкозы, дисфункцией митохондрий и увеличением продукции активных форм кислорода, обнаруживается у лиц с семейной формой БА еще до накопления бляшек A $\beta$ 1–42 (Ding et al., 2013; Wang et al., 2020).

Многие исследования также продемонстрировали, что переносчики глюкозы в значительной мере уменьшаются в головном мозге при БА, что, в свою очередь, может способствовать нарушению памяти (Correia et al., 2012; Jin et al., 2013; Bartolotti, Lazarov, 2019). Это прямо указывает на существование тесной корреляции между гипометаболизмом глюкозы и дефицитом памяти при БА (Cunnane et al., 2011).

Несмотря на ряд свидетельств того, что лактат является важным энергетическим субстратом для организма, особенно на ранних этапах онтогенеза, его присутствие в головном мозге интерпретируется как признак церебрального повреждения. Кроме того, долгое время лактат считался потенциально токсичным продуктом метаболизма, однако теперь он признан не только ключевым участником нейрон-астроглиального метаболического сопряжения, но даже предпочтительным источником энергии при определенных обстоятельствах (Tang, 2018; Muraleedharan et al., 2020).

Известно, что в физиологических условиях активация анаэробного гликолиза является обычным способом адаптации при дефиците энергии в головном мозге (Koenig, 2008).

Необходимо отметить и установленные доказательства того, что аэробный гликолиз и связанное с ним производство и транспорт лактата от астроцитов к нейронам важен для поддержания синаптической пластичности и долговременной памяти (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011). Было выявлено, что интрагиппокампальные инфузии лактата в значительной степени улучшают память у крыс, при этом эффект выражено подавляется фармакологическим ингибированием транспорта лактата в нейроны (Newman et al., 2011).

Стоит отметить, что транспорту лактата в нейроны ЦНС способствуют монокарбоксилатные транспортеры (МСТ). Известно, что МСТ1 во взрослом головном мозге экспрессируется, в основном, астроцитами и клетками церебрального эндотелия, а МСТ2 – преимущественно нейронами (Salmina et al., 2015), но экспрессия этих транспортеров может быть зарегистрирована и на других клетках, например, транспортеры МСТ1 при гипоксии активно экспрессируются на нейронах, тогда как экспрессия МСТ2 на

нейронах в данных условиях резко снижается. Интересно, что PGC-1 (стимулятор митохондриального биогенеза) увеличивает уровень МСТ1 в разных клетках (Bergersen, 2015).

Примечательно, что МСТ1 может работать и на импорт, и на экспорт лактата, в зависимости от энергетических потребностей клеток, тогда как МСТ2, в основном, используется для транспорта лактата внутрь клеток, однако некоторые авторы считают, что МСТ1 и МСТ2 в большей степени предназначены для импорта лактата, а МСТ4 – для высвобождения лактата из клеток (Bergersen, 2015).

Ряд исследований показал, что содержание лактата и уровня МСТ изменяются при патологических заболеваниях, таких как опухоль и ишемия головного мозга (Moreira et al., 2009; Pinheiro et al., 2012). Сопутствующие исследования продемонстрировали, что уровни лактата в значительной мере повышены в спинномозговой жидкости у пациентов с БА на фоне сопровождающегося гипометаболизма глюкозы (Liguori et al., 2016). Однако исследования влияния уровня лактата и содержания МСТ на нейрональную и астроглиальную дисфункцию при БА весьма ограничены.

Таким образом, цель настоящего исследования – изучение содержания лактата и содержания его транспортеров – МСТ1 и МСТ2 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы при остром токсическом действии A $\beta$ 1–42 *in vitro* и *in vivo*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для проведения исследований использовали моделирование БА в условиях *in vivo* и *in vitro*. Использование в нашем исследовании мышинной модели БА обеспечивает не только лучшее понимание поведенческих изменений, ассоциированных с нарушением экспрессии транспортеров лактата в процессе развития заболевания, но также учитывает биологическую сложность живого организма. Однако модель *in vivo* ограничивает доступность к интересующей ткани, затрудняет мониторинг в реальном времени и измерение уровня целевых маркеров при развитии заболевания, нивелируя влияние побочных факторов. Напротив, модель БА *in vitro* с использованием клеточных культур (нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов) – модель гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) с добавлением A $\beta$ 1–42 – позволяет провести исследования на живых клетках, а также дает возможность осуществлять непрерывное наблюдение за процессами, протекающими на клеточном уровне (Shin et al., 2019). Иными словами – получить подробную информацию о молекулярных механизмах в интересующих нервных клетках определенного региона головного мозга. При этом возможное влияние сопутствующих факторов, наличие которых вероятно в условиях *in vivo*, исключается. Таким об-



**Рис. 1.** Блок-схема эксперимента по определению уровня лактата и его транспортеров *in vivo*. ИК – интрагиппокампажное, ПО – послеоперационный, СФМ – спектрофотометрия, ИГХ – иммуногистохимия.

разом, модель БА *in vitro* выступает в качестве значимого дополнительного инструмента для преодоления ограничений модели заболевания на животных.

В нашем случае модель БА *in vitro* использовалась для изучения уровня лактата и содержания его транспортеров, то есть возможных метаболических изменений, происходящих в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы (в модели ГЭБ) при культивировании в присутствии Aβ1-42. Блок-схема эксперимента *in vivo* представлена на рис. 1.

**Животные и эксперименты с ними.** В работе использовали 20 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. Экспериментальная группа животных (C57BL/6 + Aβ1-42) – мыши после введения в зону гиппокампа CA1 амилоида Aβ1-42 по 1 мкл билатерально согласно стереотаксическим координатам (ML ± 1.3 мм, в AP – 2.0 мм, DV – 1.9 мм) (n = 10). Контрольная группа мышей (C57BL/6 + PBS) – ложно-оперированные животные после введения фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), растворителя для Aβ1-42 (n = 10).

Животные во всех вариантах экспериментов находились в клетках со свободным доступом к воде и корму при температуре 21 ± 1°C и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь. Планирование и проведение экспериментов на животных осуществляли при соблюдении “принципа 3R”: Replacement – использование альтернативных методов (культуры клеток); Reduction – использование минимального количества животных в эксперименте; Refinement – не подвергать животных безосновательному стрессу до, во время и после проведения эксперимента. Рандомизации не было при распределении объектов исследования. Размер выборки не рассчитывался.

Все исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных для исследования на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Мини-

стерства здравоохранения РФ (выписка из протокола № 3 от 29.10.2019 г.).

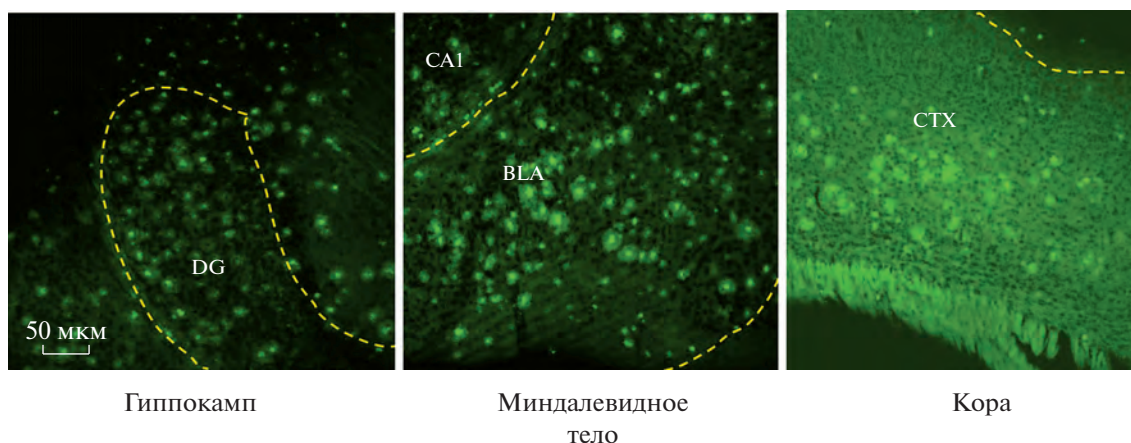
**Экспериментальное моделирование нейродегенерации *in vivo*.** Моделирование БА проводили путем интрагиппокампажного введения Aβ1-42 (Sigma-Aldrich, США) по стереотаксическим координатам мозга в зону CA1. Aβ1-42 предварительно растворяли в ДМСО (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 4 мМ, затем брали аликвоту и разбавляли в PBS (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 50 мкМ с последующей агрегацией в термостате при 37°C в течение 7 сут. 1 мкл Aβ1-42 вводили с каждой стороны гиппокампа в зону CA1 (Epelbaum et al., 2015). Контрольной группе животных вводили PBS, содержащий ДМСО в том же количестве, что и при растворении Aβ1-42, с использованием той же процедуры.

Признаки БА выявляли, начиная с 10 сут (Sipos et al., 2007) после оперативного вмешательства. Верификацию модели БА проводили с помощью окрашивания срезов головного мозга тиофлавином S (Sigma-Aldrich, США) (Комлева и др., 2015). После введения Aβ1-42 в ткани головного мозга амилоидные бляшки флуоресцировали зеленым цветом (рис. 2).

Оценку когнитивных функций у исследуемых групп животных проводили с использованием нейроповеденческого теста Fear conditioning, результаты по которому были представлены нами ранее (Горина и др., 2017).

**Микродиализ ткани головного мозга экспериментальных животных.** Сбор межклеточной жидкости (диализата) осуществляли с использованием установки для микродиализа (Eicom Corporation, США). Перед проведением микродиализа экспериментальным животным в левый желудочек головного мозга с помощью стереотаксического аппарата устанавливали направляющую канюлю по координатам ML 1 мм, в AP – 0.46 мм, DV 2.2 мм, которую затем фиксировали стоматологическим цементом.

После операции животное помещали в клетку на 5 сут для полного восстановления со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре 21 ± 1°C и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь.



**Рис. 2.** Визуализация бляшек бета-амилоида ( $A\beta_{1-42}$ ) в областях головного мозга экспериментальных мышей. DG — зубчатая извилина гиппокампа, CA1 — область гиппокампа, BLA — базолатеральное миндалевидное тело, CTX — кора.

Сбор целевых компонентов межклеточной жидкости головного мозга осуществляли с использованием искусственной спинномозговой жидкости, приготовление которой осуществляли следующим образом: в деионизованной воде (5 мл) растворяли 0.36525 г NaCl (Sigma-Aldrich, США), 0.0093 г KCl (Sigma-Aldrich, США) и 0.0075 г  $NaH_2PO_4$  (Sigma-Aldrich, США). К 0.5 мл полученного раствора добавляли 0.01092 г  $NaHCO_3$  (Sigma-Aldrich, США), 0.009 г кристаллической глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0.01 г  $CaCl_2$  (Sigma-Aldrich, США), 0.0025 г  $MgCl_2$  (Sigma-Aldrich, США) и доводили общий объем аликвоты до 5 мл. Полученный раствор фильтровали.

Сбор диализата проводился в течение 24 ч у свободнодвижущегося животного, подключенного через капилляры к направляющей канюле. Мышь находилась в прозрачном боксе со свободным доступом к воде и корму. Диализат ( $V = 20$  мкл) собирался со скоростью 0.3 мкл/мин в микропланшет, расположенный в коллекторе с системой охлаждения до  $2^\circ C$ .

**Иммуногистохимия ткани головного мозга.** Через 60 мин после проведения микродиализа осуществляли транскардиальную перфузию 4%-ным параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине pH 7.4 (Sigma-Aldrich, США), после чего погружали в 20%-ный раствор сахарозы (Sigma-Aldrich, США). С помощью микротомы (Thermo Scientific Microm HM 650, США) изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Изучали наличие и уровень целевых маркеров методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов (Encinas, Enikolorov, 2008).

После промывки в PBS срезы блокировали 3%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA, Sigma-Aldrich, США) в PBS и 1%-ном Тритоне X-100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в те-

чение ночи с первичными антителами с 3%-ным BSA в PBS и 0.2%-ным Тритоном X-100 при  $4^\circ C$ . После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. Наименование первичных и вторичных антител представлены в табл. 1. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа (Olympus FV 10i, Япония).

В иммуногистохимическом исследовании в экспериментальной и контрольной группах было по 5 животных. От каждого животного отбирали по 3 среза головного мозга. Подсчет клеток, экспрессирующих МСТ1 и МСТ2 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы, в каждом срезе в области гиппокампа проводили в трех полях зрения ( $100 \times 100$  мкм). Регистрировали среднее значение по трем полям зрения. В графическом изображении представлены среднее значение по трем полям зрения с каждого среза (число срезов  $n = 15$ ). При обработке полученных результатов принимали во внимание долю клеток, которые несли целевую метку и выражали в процентах от общего числа клеток.

**Определение уровня лактата в ткани гиппокампа и диализате *in vivo*.** Уровень лактата определяли в группах по 5 животных. Подготовку ткани гиппокампа проводили следующим образом: образцы тканей (около 10 мг ткани) промывали в холодном PBS, ресуспендировали ткань в 6-кратном объеме буфера для анализа лактата (Lactate Assay Buffer, Abcam, Великобритания) на льду с помощью гомогенизатора Даунса (WK Life Sciences GmbH, Германия), затем центрифугировали (центрифуга с охлаждением Hitachi Koki, Япония) при 11000 g в течение 5 мин при  $4^\circ C$ , после чего супернатанты собирали и переносили в чистые пробирки. Уровень лактата определяли спектрофотометрически с помощью микропланшетного фотометра (Anthos 2010; Biochrom, Великобритания) согласно протоколу производителя, пред-

**Таблица 1.** Антитела, используемые в иммуногистохимическом исследовании *in vivo* и *in vitro*

Антитела <i>in vivo</i> (разбавление 1 : 1000)	
Первичные	Вторичные
Против CD31 моноклональные мыши (MBS532307; MyBioSource, США)	Козлиные антимышинные, Alexa Fluor 488 (ab 150157; Abcam, Великобритания)
Против NSE (нейрон-специфическая энолаза) поликлональные цыпленка (GTX85462; GeneTex, США)	Козлиные антицыплячьи, Alexa Fluor 488 (ab 150169; Abcam, Великобритания)
Против GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) моноклональные мыши (MBS8241552; MyBioSource, США)	Козлиные антимышинные, Alexa Fluor 488 (ab 150113; Abcam, Великобритания)
Против MCT1 поликлональные кролика (TA321556; OriGene Technologies, США)	Ослиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150074; Abcam, Великобритания)
Против MCT2 поликлональные кролика (bs-3995R; Bioss Inc., США)	Ослиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150074; Abcam, Великобритания)
Антитела <i>in vitro</i>	
Первичные (разбавление 1 : 300)	Вторичные (разбавление 1 : 500)
Против ZO1 поликлональные козла (sc-8147; Santa Cruz, США)	Ослиные антикозьи, Alexa Fluor 488 (A11055; Thermo Fisher Scientific, США)
Против NeuN моноклональные мыши (MAB377; Merck Millipore, США)	Козлиные антимышинные, Alexa Fluor 488 (ab150117; Abcam, Великобритания)
Против GFAP поликлональные цыпленка (LS-B6299; LSBio, США)	Козлиные антицыплячьи, Alexa Fluor 555 (A-21437; Thermo Fisher Scientific, США)
Против MCT1 поликлональные кролика (LS-B14628; LSBio, США)	Козлиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150078; Abcam, Великобритания)
Против MCT2 поликлональные кролика (ab224627; Abcam, Великобритания)	Ослиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150074; Abcam, Великобритания)

ставленного в наборе L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (Abcam, Великобритания).

**Получение первичных культур клеток и моделирование нейроваскулярной единицы/ГЭБ.** Блок-схема эксперимента *in vitro* представлена на рис. 3. В работе использовали первичные культуры клеток церебрального эндотелия, астроцитов и нейронов, выделенные из головного мозга эмбрионов мыши линии C57BL/6 (общее число животных 32).

**Выделение церебральных эндотелиоцитов** проводили по модифицированному протоколу (Liu et al., 2013). Кору головного мозга выделяли в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия), мелко измельчали и центрифугировали при 150 g и комнатной температуре в течение 3 мин. Затем к осадку добавляли двукратный объем 25%-ного раствора фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, Южная Америка), тритурировали 25 раз пипеткой 5 мл с последующим центрифугированием гомогената при 600 g и комнатной температуре в течение 10 мин. Забирали нижний слой и переносили в коническую пробирку. Повторяли этапы тритурирования и центрифугирования 3 раза. Затем проводили ферментативную обработку пеллета в двукратном объеме (по отношению к объему пеллета) 0.1%-ного раствора коллагене-

назы II (ПанЭко, Россия) при температуре 37°C в течение 35 мин с периодическим перемешиванием. Затем проводили ресуспензирование осадка с последующим центрифугированием при 150 g в течение 5 мин.

Культивирование фрагментов и отдельных эндотелиальных клеток осуществляли при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах, предварительно покрытых желатином (Gelatin Solution 0.1%, Biological Industries, США) в культуральной среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 20% раствора FBS (ПанЭко, Россия), 3 мг/мл глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0.58 мг/мл глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 Ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, Южная Америка); смену среды проводили каждые 3 сут. Клетки во флаконе промывали 2 раза раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) и обрабатывали 0.25%-ным раствором трипсина и ЭДТА (ПанЭко, Россия). Смену среды осуществляли каждые 2–3 сут.

**Выделение и культивирование нейросфер.** Головной мозг помещали в ледяной 2%-ный раствор глюкозы в PBS, затем выделяли интересующие области (гиппокамп, стенки боковых желудочков) и иссекали до размеров 1 мм<sup>3</sup>. Далее переносили в свежий

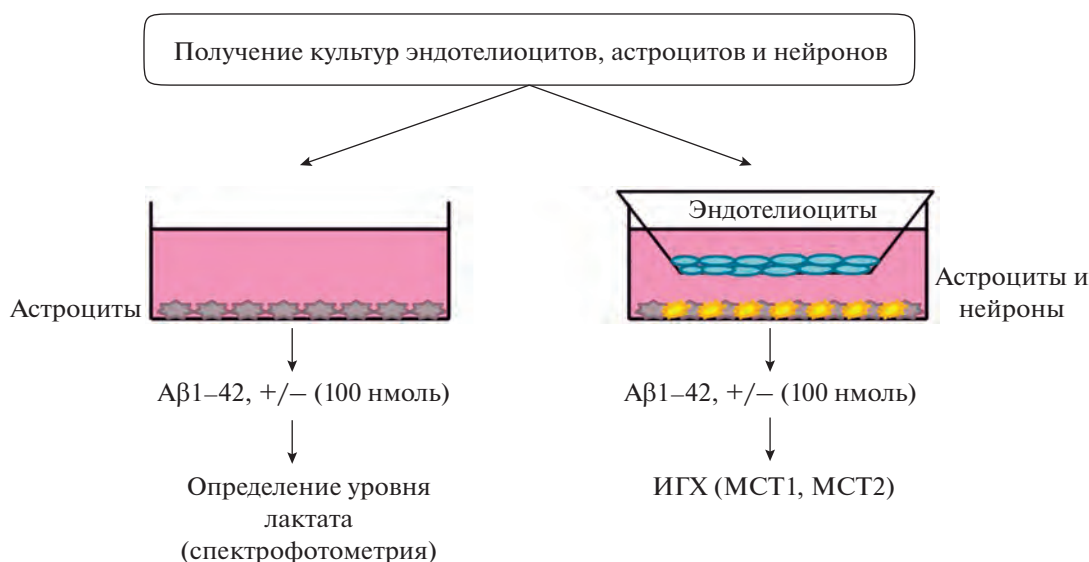


Рис. 3. Схема-дизайн эксперимента по определению уровня лактата и его транспортеров *in vitro*. ИГХ – иммуногистохимия.

2%-ный раствор глюкозы в PBS на 1 мин. После осаждения ткани супернатант удаляли. Оставшуюся ткань ресуспендировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США). Тритурацию ткани проводили (около 30 раз) стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. Затем добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Через 2 мин после осаждения неразделенных кусочков ткани собирали супернатант и переносили его в другую пробирку. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией.

С помощью цитометра Scepter Cell Counter (Millipore, США) проводили подсчет клеток. Клетки ( $1.5 \times 10^6$  кл./мл) сеяли в культуральные флаконы T-75  $\text{cm}^2$  с 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation и культивировали в условиях инкубатора при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . Образование нейросфер наблюдали через 24–48 ч.

**Получение культуры астроцитов.** Проводили направленную дифференцировку нейросфер в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США) следующего состава: базальная среда (Basal Medium, ScienCell, США), 10% FBS (HyClone, США), AGS (ScienCell, США), раствора пенициллина-стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 Ед./мл. Через 7–9 сут наблюдали образование монослоя астроцитов.

**Получение сокультуры астроцитов и нейронов.** Сокультуру получали из нейросфер путем направленной дифференцировки в астроциты и нейроны (Моргун и др., 2013). В качестве культуральной среды использовали NeuroCult NS-A Proliferation Kit, с

добавлением гепарина, основного фактора роста фибробластов ( $\beta$ FGF) и эпидермального фактора роста (EGF). Полученные клетки ( $1.5 \times 10^6$  кл./мл) засеяли в культуральные флаконы T-75  $\text{cm}^2$  с 25 мл среды. Далее проводили дифференцировку нейросфер в астроциты и нейроны в культуральной среде NeuroCult NS-A Differentiation Kit.

**Получение модели ГЭБ *in vitro*.** Смесь астроцитов и нейронов помещали на дно культурального планшета, после устанавливали культуральную вставку (Corning-Costar, США), на которую помещали эндотелиоциты. Для получения модели нейроваскулярной единицы эндотелиоциты культивировали совместно с астроцитами и нейронами (при соотношении 1 : 2 : 1 соответственно) в культуральном планшете в среде DMEM с FBS, глутамином и смесью антибиотиков при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ .

**Моделирование острого токсического действия Aβ1-42 *in vitro*.** Для исследования действия Aβ1-42 на культуру изолированных астроцитов клетки экспериментальной группы культивировали в среде, содержащей Aβ1-42 в конечной концентрации 100 нмоль. Через 24 ч производили забор культуральной среды для последующего определения в ней концентрации лактата. В экспериментальной и контрольной группах было по 6 лунок.

Для исследования острого токсического действия Aβ1-42 в модели ГЭБ к клеткам добавляли Aβ1-42 в той же конечной концентрации (100 нмоль) в питательной среде. Через 24 ч и 48 ч оценивали изменение уровня исследуемых молекул на каждом типе клеток (астроцитах нейронах, эндотелиоцитах). В обеих группах было по 10.

**Оценка уровня лактата в среде культивирования астроцитов в присутствии и отсутствии Aβ1-42.** Опре-

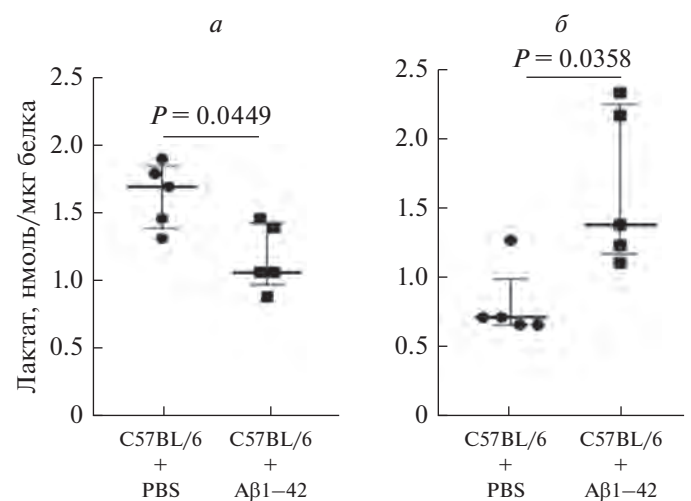
деление уровня лактата (Colorimetric/Fluorometric) проводили по стандартному протоколу фирмы-изготовителя (Abcam, Великобритания) в среде, в которой культивировались астроциты с добавлением Аβ1–42 (в конечной концентрации 100 нмоль) и без его добавления (контроль). Для этого смешивали 50 мкл образца с 50 мкл реакционной смеси (46 мкл Lactate Assay Buffer, 2 мкл Lactate Probe, 2 мкл Enzyme Mix), инкубировали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 30 мин. Оптическую плотность определяли с помощью микропланшетного ридера CLARIOstar Plus (Германия) при длине волны 492 нм. Полученные результаты выражали в нмоль на 1 лунку по данным калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам различной концентрации (0, 2, 4, 6, 8 и 10 нмоль/мкл), приготовленным из стандарта, прилагаемого в наборе.

**Иммуногистохимическое исследование *in vitro*.** Регистрацию уровня МСТ1 и МСТ2 в клетках эндотелия, нейронах и астроцитах, культивируемых совместно в течение 24 и 48 ч, осуществляли в модели ГЭБ после добавления 100 нмоль Аβ1–42 и без его добавления (контроль). Первичные антитела для иммуногистохимического исследования (см. табл. 2) использовали в рабочем разведении 1 : 300. Время инкубации составляло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела использовали в разведении 1 : 500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C (табл. 1).

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Каждый эксперимент повторяли 10 раз. Считали клетки, позитивные по каждому виду антигена в образце (не менее 5 полей зрения). При обработке полученных результатов принимали во внимание долю клеток, которые несли целевую метку и выражали ее в процентах от общего числа клеток (100%).

**Статистический анализ.** Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ GraphPad Prism 8.0.1 (версия 8.0, США) и Statplus Professional (AnalystSoft Inc, США), сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 и GraphPad 6.0 (США). В связи с отсутствием нормальности распределения сравнение двух групп проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости  $P = 0.05$ . Результаты представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль.

**Реактивы.** Использовали Аβ1–42, ДМСО, PBS, тиофлавин S, глутамин, NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, параформальдегид, сахарозу, BSA и Triton X-100 от Sigma-Aldrich (США); лактат (Lactate Assay Buffer), L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (Abcam, Великобритания); культуральную среду DMEM, раствор Хенкса, раствор трипсина и коллагеназу II, ЭДТА (ПанЭко, Россия); фетальную бычью сыворотку (FBS), пени-



**Рис. 4.** Уровни лактата в ткани головного мозга при остром токсическом действии Аβ1–42 *in vivo*. Концентрация лактата в ткани гиппокампа (а) и в диализате головного мозга (б) животных с интрагиппокампулярным введением Аβ1–42 (C57BL/6 + Аβ1–42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6 + PBS). Данные показаны в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль,  $P$  – уровень значимости.

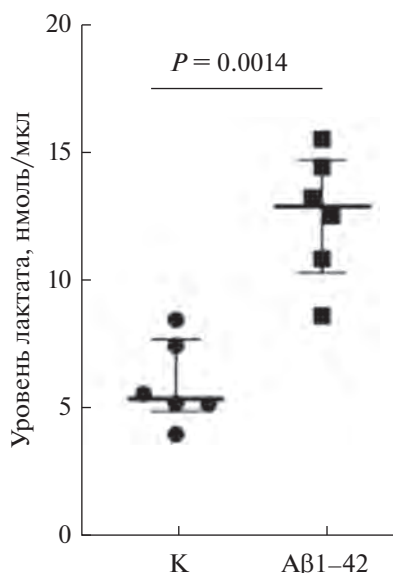
циллин, стрептомицина (HyClone, Южная Америка), NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США), среду Astrocyte Medium (ScienCell, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы оценили уровни лактата в ткани и во внеклеточном пространстве (диализате) головного мозга в норме и при остром токсическом действии Аβ1–42 *in vivo*. В ходе исследований установлено, что уровень лактата в гиппокампе животных опытной группы значимо ( $P = 0.0449$ ) снижается по сравнению с ложно-оперированными животными. Интересно, что во внеклеточном пространстве головного мозга наблюдается противоположная картина, а именно высокий уровень лактата в условиях острого действия Аβ1–42 ( $P = 0.0358$ ) по сравнению с ложно-оперированными животными (рис. 4).

Для выяснения вклада астроцитов в продукцию лактата при токсическом действии Аβ1–42 мы проанализировали уровень лактата в среде культивирования клеток. При оценке концентрации лактата в среде выявлено, что в астроцитах, культивируемых в присутствии Аβ1–42 (100 нмоль), уровень лактата в среде значимо выше, чем в астроцитах контрольной группы ( $P = 0.0014$ ) (рис. 5).

Определение уровня МСТ1 в экспериментальных группах *in vivo* показало статистически значимое ( $P = 0.0308$ ) снижение уровня МСТ1 в нейронах в гиппокампе головного мозга у животных с интрагиппокампулярным введением Аβ1–42 по сравнению с ложно-оперированными животными (рис. 6а, 7).



**Рис. 5.** Уровень лактата в среде культивирования астроцитов *in vitro* в физиологических условиях в отсутствие (контроль, К) и в присутствии  $A\beta 1-42$  (100 нмоль). Данные показаны в виде Ме [Q1; Q3],  $P$  – уровень значимости (U-критерий Манна–Уитни).

Аналогичную ситуацию наблюдали и при исследовании содержания МСТ1 на астроцитах и эндотелиоцитах в гиппокампе, а именно, выраженное снижение ( $P = 0.0492$  и  $P = 0.0284$  соответственно) у животных экспериментальной группы по сравнению с контролем (рис. 6б–в, 8, 9).

Кроме того, нами установлено, что при остром токсическом действии  $A\beta 1-42$  значительно снижается и уровень МСТ2 как в нейронах (рис. 10, 11), так и в

астроцитах и эндотелиоцитах по сравнению с контрольной группой (рис. 10, 12, 13).

При анализе уровня МСТ1 в клетках нейроваскулярной единицы/ГЭБ как в физиологических условиях, так и в присутствии  $A\beta 1-42$  статистически значимых отличий выявлено не было ( $P > 0.05$ ). Однако наблюдали тенденцию к снижению количества МСТ1-позитивных астроцитов и нейронов (рис. 14).

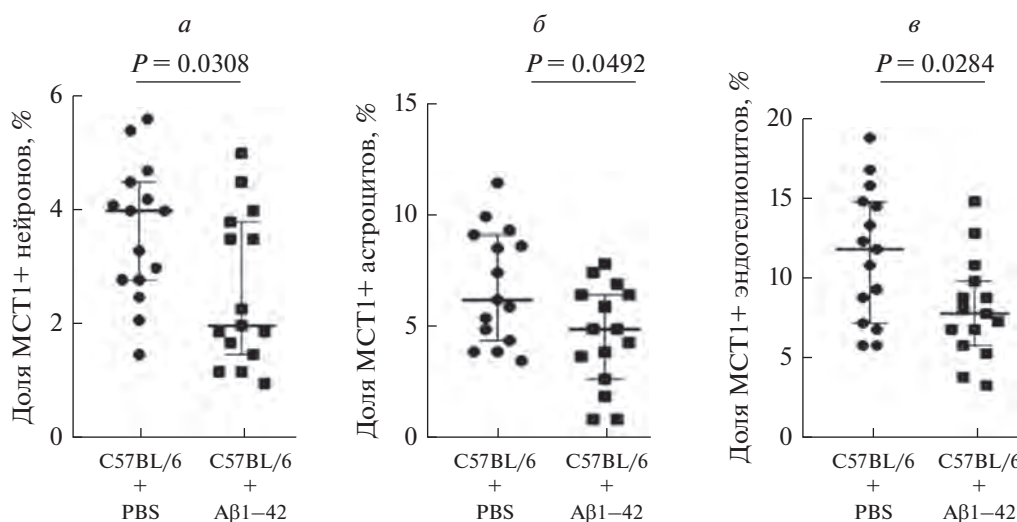
При культивировании клеток нейроваскулярной единицы/ГЭБ в присутствии  $A\beta 1-42$  в течение 48 ч произошло значимое снижение уровня МСТ2 в нейронах ( $P \leq 0.05$ ; рис. 15в). Также была выявлена тенденция к снижению МСТ2-иммунопозитивных эндотелиоцитов и астроцитов (рис. 15а, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как установлено в одной из работ, высокий уровень церебрального лактата во фронтальной коре мышей с генетической моделью БА (линия APP/PS1), обусловленный нарушением обработки лактата, коррелировал со снижением пространственной памяти (Harris, 2017).

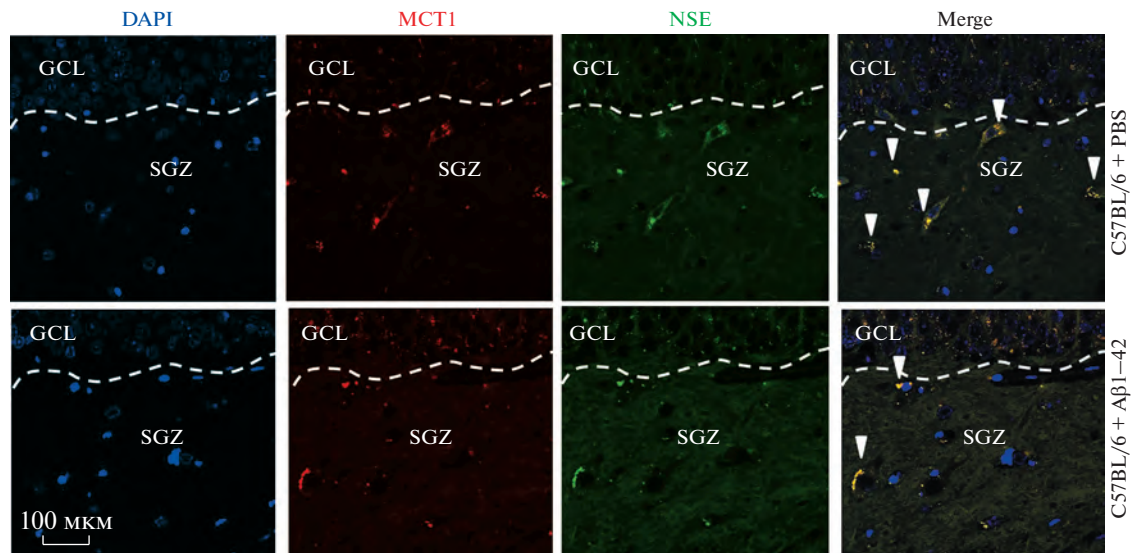
Согласно результатам клинических исследований, у пациентов с БА увеличение уровня лактата в переднем отделе поясной извилины находится в тесной взаимосвязи со степенью выраженности когнитивных нарушений (Лобзин и др., 2013).

Интересно, что лечение L-лактатом после ишемического инсульта оказывало нейропротекторный эффект и снижало неврологический дефицит у мышей (Berthet et al., 2012). Примечательно, что этот эффект лактат оказывает через активацию транскрипции экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF), как было показано на астроцитах человека, а также на клеточной линии SH-SY5Y (Coco et al.,

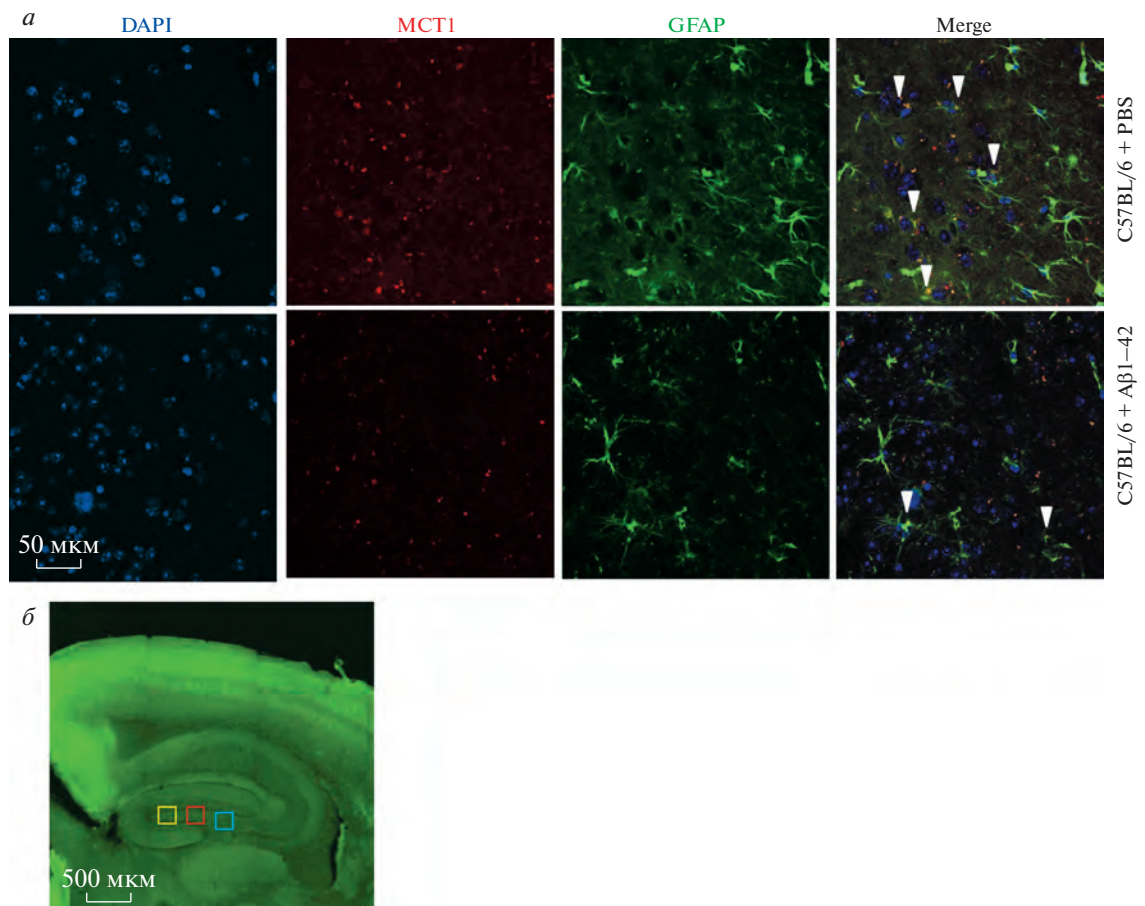


**Рис. 6.** Уровень МСТ1 в нейронах (а), астроцитах (б) и эндотелиоцитах (в) в гиппокампе головного мозга *in vivo* у животных с интрагиппокампальным введением  $A\beta 1-42$  (C57BL/6 +  $A\beta 1-42$ ) и ложно-оперированных животных (C57BL/6 + PBS). Данные показаны в виде Ме [Q1; Q3],  $P$  – уровень значимости (U-критерий Манна–Уитни).

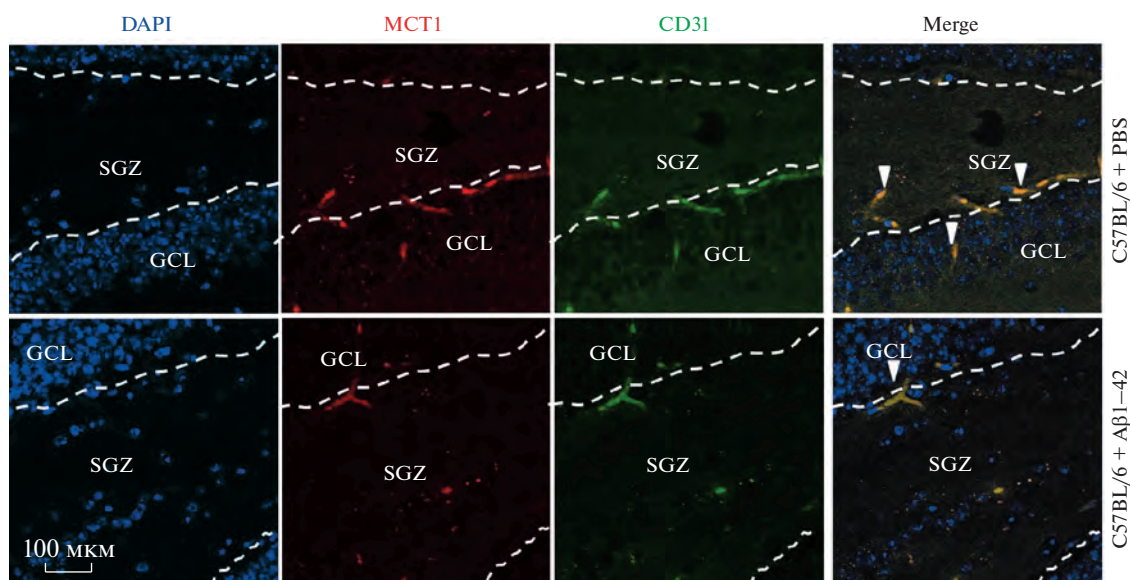




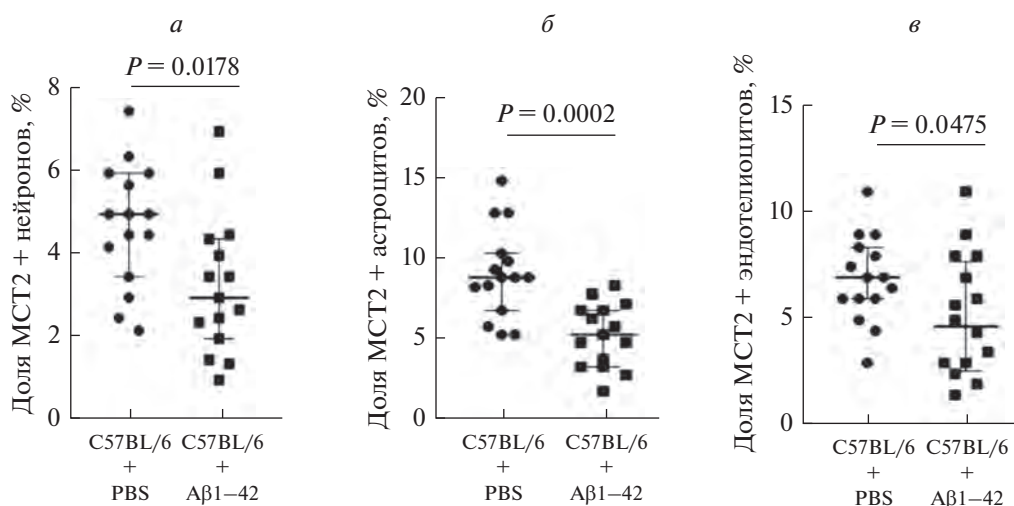
**Рис. 7.** Уровень МСТ1 в нейронах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. Маркер МСТ1 – красный, NSE (нейрон-специфическая энолаза) – зеленый, ядра окрашены DAPI (синий цвет). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Стрелками на совмещенных изображениях (Merge) показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.



**Рис. 8.** МСТ1 в астроцитах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. *a* – МСТ1 (красный цвет), GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок; зеленый) и ядра, окрашенные DAPI (синий); стрелками на совмещенных изображениях (Merge) показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×. *б* – Сагитальный срез гиппокампа мыши с обозначением полей зрения в зубчатой извилине (зеленый цвет – белок GFAP. Увел. об.: 1×.



**Рис. 9.** МСТ1 в эндотелиоцитах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. CD31 показан зеленым цветом, ядра – синим (DAPI). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Стрелками показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

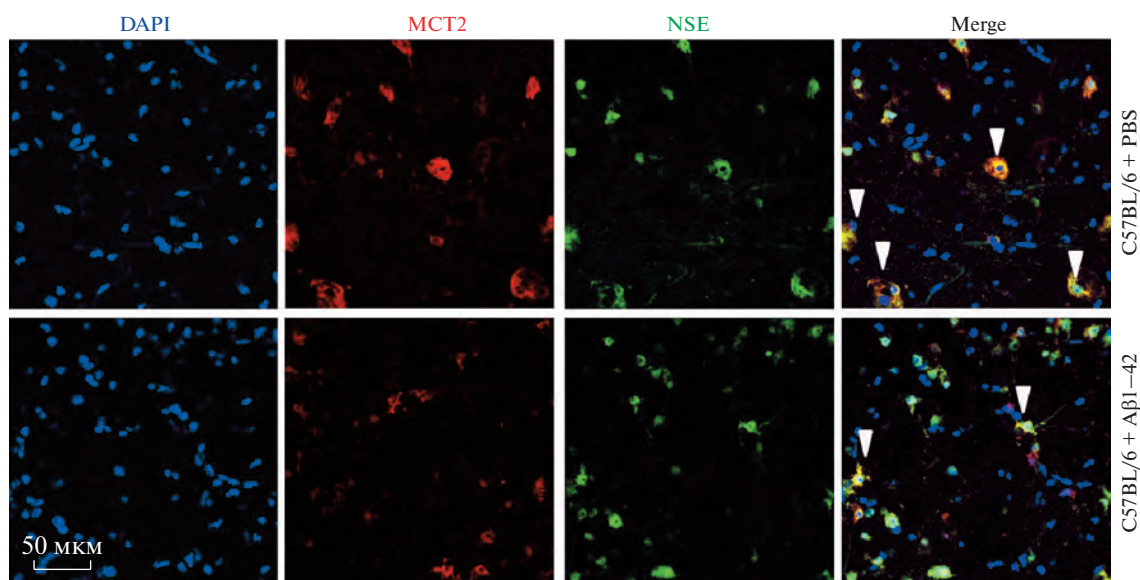


**Рис. 10.** Уровень МСТ2 в гиппокампе головного мозга животных *in vivo* на нейронах (а), астроцитах (б) и эндотелиоцитах (в) у животных с интрагиппокампулярным введением Аβ1-42 (C57BL/6 + Ab1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6 + PBS). Доля положительных клеток представлена в процентах от общего числа клеток в поле зрения. Данные показаны в виде Me [Q1; Q3], *P* – уровень значимости (U-критерий Манна–Уитни).

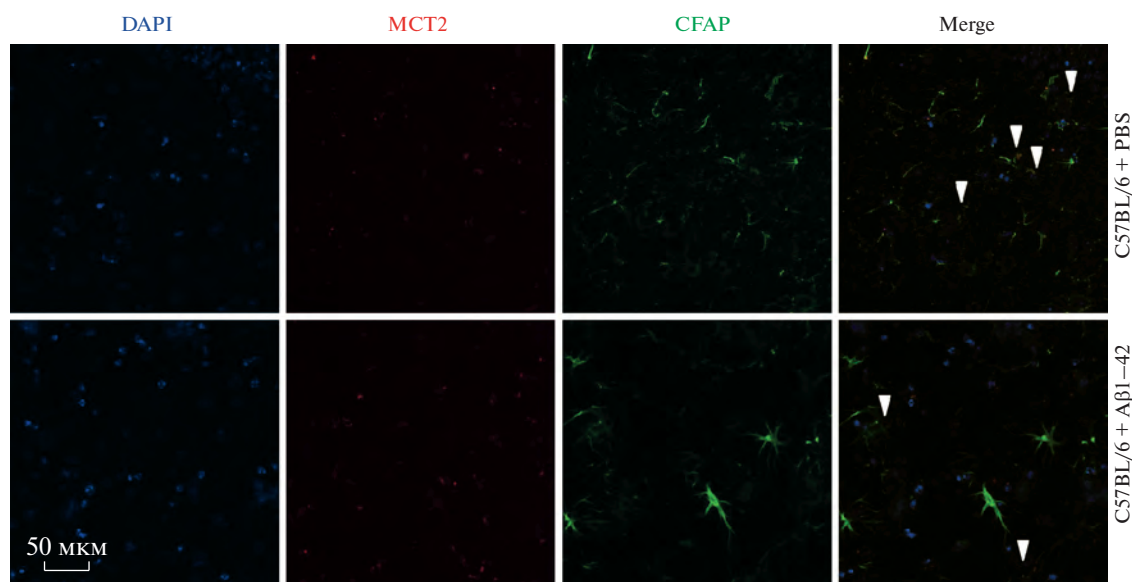
2013). При этом важно отметить, что BDNF является не только необходимым фактором выживания нервных клеток в ЦНС, но и играет существенную роль в реализации долговременной памяти (Bekinschtein et al., 2008).

Более того, экзогенный лактат, как было показано, увеличивает экспрессию мРНК и белков – как МСТ1, так и цитохром-с-оксидазы в мышечных клетках (Hashimoto et al., 2007). Таким образом, лак-

тат может вызывать ряд событий, ведущих к активации факторов транскрипции, участвующих в обеспечении его транспорта и возможном процессинге через митохондрии. Кроме того, в нескольких исследованиях сообщалось, что лактат увеличивает вазодилатацию (Yamanishi et al., 2006; Gordon et al., 2016), а непрерывное производство лактата в активированном головном мозге может служить сигнальным механизмом для увеличения кровотока и доставки лактата в мозг.



**Рис. 11.** Уровень MCT2 в нейронах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. Маркеры: MCT2 – красный, NSE (нейрон-специфическая энолаза) – зеленый, ядра – синий (DAPI). Стрелками на совмещенных изображениях (Merge) показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

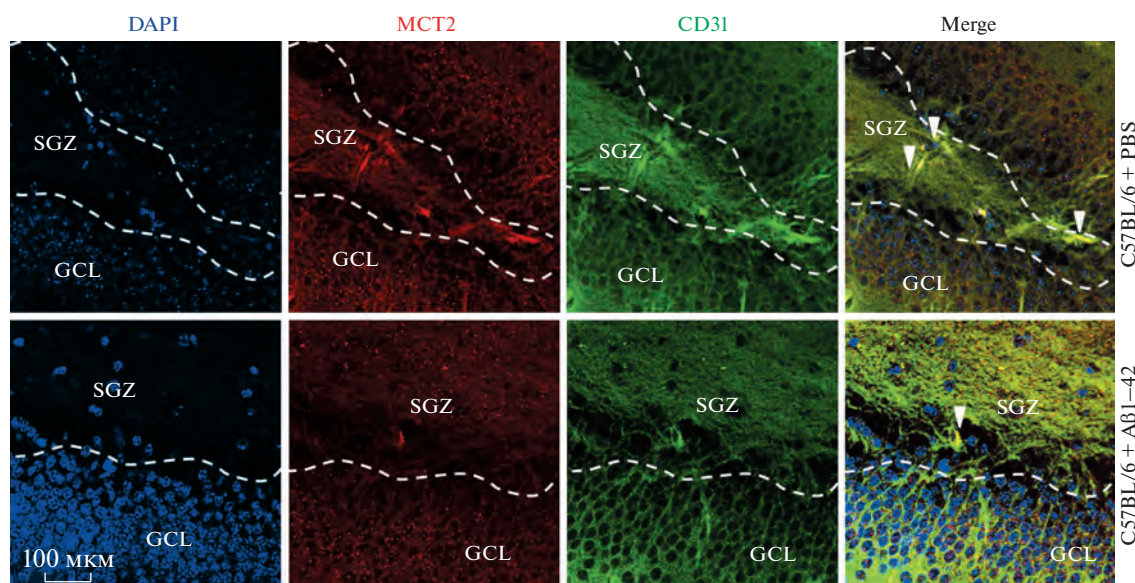


**Рис. 12.** MCT2 в астроцитах в гиппокампе головного мозга животных экспериментальных групп *in vivo*. Маркеры: MCT2 – красный, GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок – зеленый, ядра – синий (DAPI). Стрелками обозначены клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

Установленное нами значительное увеличение уровня лактата в диализате животных экспериментальной группы соответствует данным из литературы о высокой концентрации лактата в спинномозговой жидкости пациентов с БА, что связывают с токсическим действием тау-белка на митохондрии (Liguori et al., 2015). Более того, обратная зависимость между локальным низким метаболизмом глюкозы в ткани головного мозга при БА и высоким

уровнем лактата в ликворе интерпретируется некоторыми авторами как признак нейродегенерации при БА (Liguori et al., 2016).

Также показано, что Aβ1–42 увеличивает поглощение глюкозы и гликолиз, производство перекиси водорода и высвобождение глутатиона в культивируемых астроцитах. Aβ-индуцированные изменения метаболизма глюкозы связаны с агрегацией, интернализацией и клиренсом Aβ1–42 в астроцитах (Niel-



**Рис. 13.** MCT2 в эндотелиоцитах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. Маркер MCT2 – красный, CD31 – зеленый, ядра – синий (DAPI). GCL – гранулярный слой, SGZ – субгранулярная зона. Стрелки показывают клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

sen et al., 2009; Mohamed, Posse de Chaves, 2011). Следствием внутриклеточного накопления A $\beta$ 1–42 является изменение метаболизма астроцитарной глюкозы, что приводит к снижению глутатиона и лактата, а это, в свою очередь, способствует повышенной уязвимости соседних нейронов (Allaman et al., 2010).

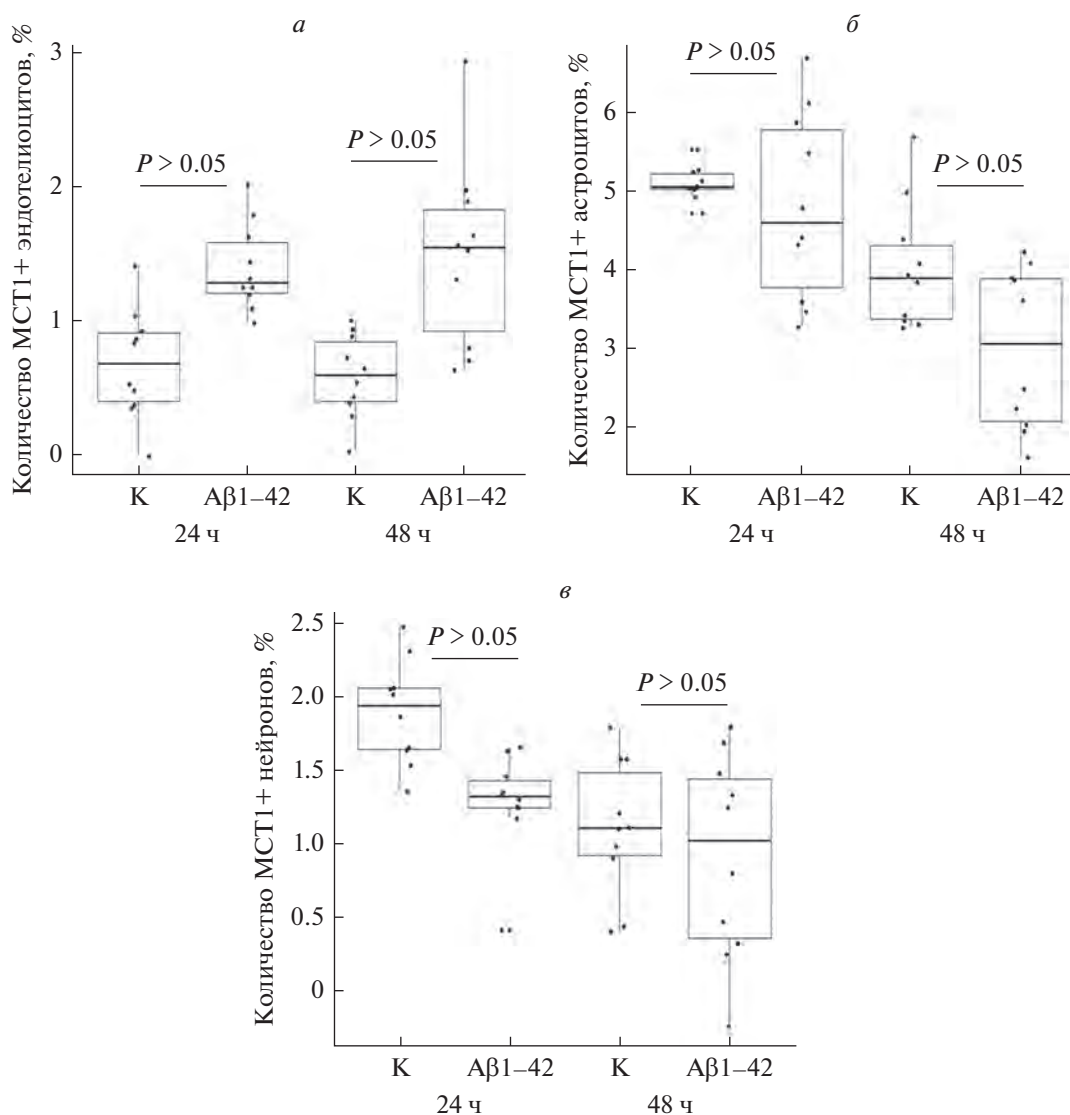
Необходимо отметить и тот установленный факт, что транспортеры семейства MCT играют важную роль в метаболических взаимодействиях между клетками головного мозга (Pierre, Pellerin, 2005; Cunnane et al., 2011). Так, установлено, что нарушение уровня транспортеров MCT1 и MCT4 в астроцитах вызывает амнезию, которая, как и нарушение долговременной потенциации, предотвращается введением экзогенного лактата. Нарушение содержания MCT2 в нейронах также приводит к амнезии, однако введение лактата не оказывает значимого влияние, что позволяет предположить, что транспорт лактата из астроцитов в нейроны необходим для формирования долговременной памяти и синаптической пластичности (Suzuki et al., 2011). В другой работе показано, что лактат, транспортируемый из астроцитов в нейроны с помощью MCT1–MCT4, необходим для поддержания синаптической передачи в возбуждающих синапсах даже при условии наличия достаточного запаса глюкозы и внутриклеточного АТФ (Nagase et al., 2014). Кроме того, MCT1 может стимулировать митохондриальный метаболизм, тем самым облегчая использование лактата в качестве метаболического субстрата для цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования (Harris, Attwell, 2012; Hui et al., 2017). С другой стороны, дисфункция MCT1 может привести к аберрантному переносу лактата, что, в свою очередь,

приведет к нарушению энергетического обмена и когнитивному дефициту (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011; Boury-Jamot et al., 2016).

Так, в ходе одного из исследований у мышей (линия C57BL/6) в гиппокампе выявлены изменения экспрессии генов, вызванные обучением, которые участвуют в метаболическом взаимодействии астроцитов и нейронов, а именно: через 24 ч после тренировки в тесте ингибирующего избегания наблюдали повышенную экспрессию генов, кодирующих транспортеры MCT1 и MCT4, альфа2-субъединицу Na/K-АТФазы и транспортер глюкозы GLUT1. Примечательно, что при оценке функциональной роли одного из этих генов, участвующих в обучении (гена MCT1), обнаружено нарушение долговременной памяти у MCT1-нокаутных мышей (Tadi et al., 2015).

В другом исследовании продемонстрировано, что подавление MCT1 и MCT4 в глиальных клетках и MCT2 в нейронах гиппокампа крыс вызывает нарушение процесса обучения и дисфункцию памяти (Pérez-Escuredo et al., 2016). Снижение содержания лактата, сопровождающееся подавлением экспрессии гена MCT в коре головного мозга и гиппокампе, способствовало нарушению пространственного обучения и памяти у крыс с моделью БА (Lu et al., 2015). В целом, это убедительно доказывает значимое влияние лактата и MCT на энергетический метаболизм, формирование гиппокамп-зависимой памяти и активность нейронов гиппокампа, что существенным образом нарушается при развитии БА.

Таким образом, установленное нами снижение уровня лактата в ткани головного мозга и увеличение уровня лактата в диализате при остром токсиче-



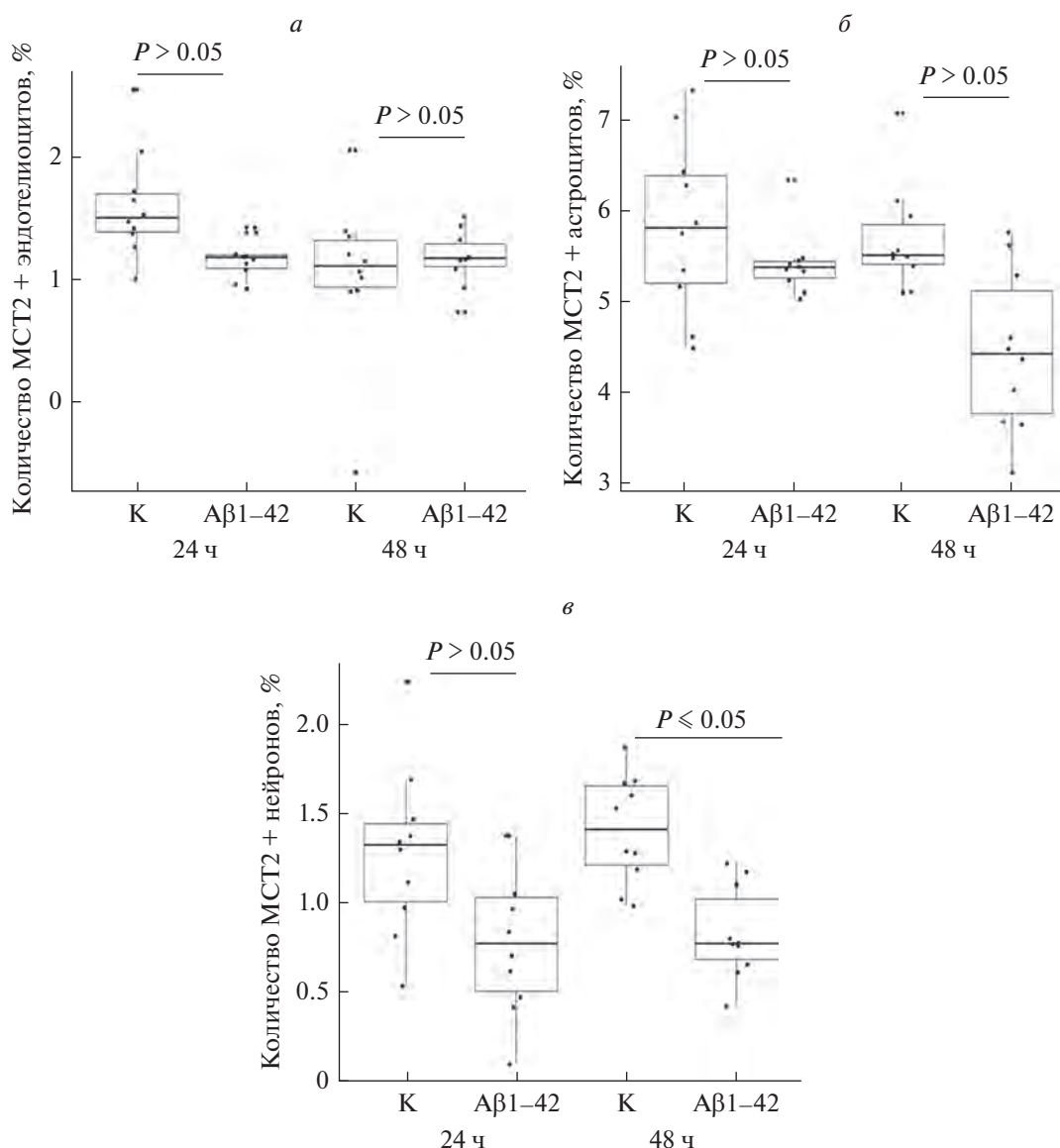
**Рис. 14.** Уровень МСТ1 в клетках нейроваскулярной единицы/ГЭБ при их культивировании в течение 24 и 48 ч в отсутствие (контроль, К) и в присутствии Аβ1-42 (100 нМ). *а* – Эндотелиоциты, *б* – астроциты, *в* – нейроны ( $P > 0.05$  – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна–Уитни). Доли положительных клеток представлены в % от общего числа клеток в поле зрения. Данные показаны в виде Ме [Q1; Q3],  $P$  – уровень значимости.

ском действии Аβ1-42 *in vivo* являются признаками нарушения энергетического метаболизма вследствие токсического действия Аβ1-42 на нервные клетки.

В дополнение к этому, нами выявлено, что клетки астроглии под влиянием Аβ1-42 *in vitro* характеризуются повышенной продукцией лактата, что, в совокупности с представленными выше результатами дает право предполагать, что они вносят важный вклад в увеличение уровня лактата во внеклеточном пространстве, сохраняя свою гликолитическую активность.

Это сопряжено с зарегистрированным нами при остром токсическом действии Аβ1-42 *in vivo* и *in vitro* снижением уровня импорт-ориентированных изо-

форм МСТ в нейронах, астроглии и церебральном эндотелии. С учетом полученных нами ранее данных о гипометаболизме глюкозы при развитии БА (Горина и др., 2017), логично предположить, что такие изменения уровня МСТ1 и МСТ2 маркируют энергодефицит в ткани головного мозга. Это соответствует результатам, полученным у животных с генетической моделью БА (линия APP/PS1), что приводит к лактат-дефициту в нейронах, в норме зависящих от транспорта лактата из гликолитически активных астроцитов (Zhang et al., 2018). Более того, согласно ранее полученным нами результатам (Горина и др., 2017), при остром токсическом действии Аβ1-42 у мышей выявлено нарушение ассоциативного обучения и эмоциональной памяти в тесте “Fear condi-



**Рис. 15.** Уровень MCT2 в клетках нейроваскулярной единицы/ГЭБ при культивировании *in vitro* в отсутствие (контроль, К) и в присутствии Aβ1-42 (100 нМ). а – Эндотелиоциты, б – астроциты, в – нейроны ( $P > 0.05$  – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна–Уитни). Доля положительных клеток представлена в процентах от общего числа клеток в поле зрения. Данные показаны в виде Me [Q1; Q3],  $P$  – уровень значимости.

tioning” (условного рефлекса страха), о чем указывало отсутствие формирования условного рефлекса на протяжении всего периода тестирования в ответ на неприятный стимул. Это позволяет сделать предположение о том, что установленные патологические изменения поведения сопряжены с нарушением уровня транспортеров лактата в клетках головного мозга в условиях острого токсического действия Aβ1-42.

Таким образом, установлено, что в условиях острого токсического действия Aβ1-42 у экспериментальных животных наблюдается снижение уровня лактата в ткани гиппокампа и повышение его

уровня в диализате *in vivo*, которое сопряжено с aberrантной экспрессией транспортеров лактата MCT1 и MCT2 в нейронах, астроглии и церебральном эндотелии. В свою очередь, это может препятствовать транспорту лактата от глиальных клеток до нейронов, вызывая выраженный дефицит лактата в нейронах. В совокупности это указывает о нарушении энергетического метаболизма вследствие Aβ-индуцированного патологического изменения церебрального метаболизма глюкозы. При этом зафиксированное нами выраженное увеличение продукции лактата астроцитами *in vitro* может свидетельствовать о включении компенсаторного механизма, направленного на

поддержание межклеточного метаболического сопряжения в поврежденных регионах головного мозга.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием ресурсной базы Центра коллективного пользования Молекулярные и клеточные технологии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Программы Президента РФ – государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-2547.2020.7).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на животных проводили с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Протокол экспериментов был одобрен биоэтической комиссией по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 3 от 08 октября 2019 г.). Каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований авторы не проводили.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. 2017. Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалинах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Бюлл. сибирской мед. № 6. С. 1. (Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Chernykh A.I., Salmina A.B. 2017. Influence of insulin resistance on increased risk of brain amygdala development in experimental Alzheimer's disease. Bulletin of Siberian medicine. № 6. P. 1.)
- Комлева Ю.К., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Салмина А.Б. 2015. Экспрессия молекул CD38 и CD157 в олифакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Сибирское медицинское обозрение. № 5. С. 45. (Komleva Yu.K., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Volkova V.V., Salmina A.B. 2015. Expression of CD38 and CD157 molecules in the olfactory bulbs of the brain in experimental Alzheimer's disease. Siberian Med. Rev. № 5. P. 45.)
- Лобзин В.Ю., Одинак М.М., Фокин В.А., Воробьев С.В., Емелин А.Ю., Лупанов И.А., Кудяшева А.В., Соколов А.В. 2013. Метаболические изменения головного мозга при болезни Альцгеймера, сосудистой и смешанной деменции. Биомед. журнал медлайн.ру. С. 1085. (Lobzin V.Yu., Odinak M.M., Fokin V.A., Vorobyov S.V., Emelin A.Yu., Lupanov I.A., Kudyasheva A.V., Sokolov A.V. 2013. Brain metabolic changes in Alzheimer's disease, vascular and mixed dementia. Biomed. J. Medline.ru. P. 1085.)
- Моргун А.В., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Кутищева И.А., Окунева О.С., Дробушевская А.И., Хилажева Е.Д., Черепанов С.М., Салмина А.Б. 2013. Дифференцировка эмбриональных прогениторных клеток мозга крыс в астроциты и нейроны. Сибирское мед. обозрение. № 6. С. 9. (Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Komleva Yu.K., Kutishcheva I.A., Okuneva O.S., Drobushhevskaya A.I., Khilazheva E.D., Cherepanov S.M., Salmina A.B. 2013. Differentiation of rat brain embryonic progenitor cells into astrocytes and neurons. Siberian Med. Rev. № 6. P. 9.)
- Allaman I., Gavillet M., Bélanger M., Laroche T., Viertl D., Lashuel H.A., Magistretti P.J. 2010. Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. J. Neurosci. V. 30. P. 3326. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010>
- Bartolotti N., Lazarov O. 2019. CREB signals as PBMc-based biomarkers of cognitive dysfunction: a novel perspective of the brain-immune axis. Brain Behav. Immun. V. 78. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.004>
- Bekinschtein P., Cammarota M., Katze C., Slipczuk L., Rossato J.I., Goldin A., Izquierdo I., Medina J.H. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 105. P. 2711. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711863105>
- Bergersen L.H. 2015. Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. J. Cereb. Blood Flow. Metab. V. 35. P. 176. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.206>
- Berthet C., Castillo X., Magistretti P.J., Hirt L. 2012. New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. Cerebrovasc. Dis. V. 34. P. 329. <https://doi.org/10.1159/000343657>
- Bolaños J.P., Almeida A., Moncada S. 2010. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? Trends Biochem. Sci. V. 35. P. 145. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>
- Bondi M.W., Edmonds E.C., Salmon D.P. 2017. Alzheimer's disease: past, present, and future. J. Int. Neuropsychol. Soc. V. 23. P. 818. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Boury-Jamot B., Carrard A., Martin J.L., Halfon O., Magistretti P.J., Boutrel B. 2016. Disrupting astrocyte-neuron lactate transfer persistently reduces conditioned responses to cocaine. Mol. Psychiatry. V. 21. P. 1070. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.157>
- Coco M., Caggia S., Musumeci G., Perciavalle V., Graziano A.C.E., Pannuzzo G., Cardile V. 2013. Sodium L-lactate differently affects brain-derived neurotrophic factor, inducible nitric oxide synthase, and heat shock protein 70 kDa production in human astrocytes and SH-SY5Y cultures. J. Neurosci.

- Res. V. 91. P. 313.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.23154>
- Correia S.C., Santos R.X., Carvalho C., Cardoso S., Candeias E., Santos M.S., Oliveira C.R., Moreira P.I.* 2012. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res.* V. 1441. P. 64.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.063>
- Croteau E., Castellano C.A., Fortier M., Bocti C., Fulop T., Paquet N., Cunnane S.C.* 2018. A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* V.107. P.18.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.004>
- Cunnane S., Nugent S., Roy M., Courchesne-Loyer A., Croteau E., Tremblay S., Castellano A., Pifferi F., Bocti C., Paquet N., Begdouri H., Bentourkia M., Turcotte E., Allard M., Barberger-Gateau P., Fulop T., Rapoport S.I.* 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition.* V. 27. P. 3.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.021>
- Ding F., Yao J., Rettberg J.R., Chen S., Brinton R.D.* 2013. Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for bioenergetic intervention. *PLoS One.* V. 8. P. e79977.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079977>
- Encinas J.M., Enikolopov G.* 2008. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol.* V. 85. P. 243.  
[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)85011-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85011-X)
- Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B.* 2015. Acute amnesic encephalopathy in amyloid- $\beta$  oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. *Neurobiol Aging.* V. 36. P. 2043.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005>
- Falkowska A., Gutowska I., Goschorska M., Nowacki P., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I.* 2015. Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* V. 16. P. 25959.  
<https://doi.org/10.3390/ijms161125939>
- Forlenza O.V., Diniz B.S., Gattaz W.F.* 2010. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med.* V. 8. P. 89.  
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-89>
- Gordon G.R., Howarth C., MacVicar B.A.* 2016. Bidirectional control of blood flow by astrocytes: a role for tissue oxygen and other metabolic factors. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 903. P. 209.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9_15)
- Harris J.J., Attwell D.* 2012. The energetics of CNS white matter. *J. Neurosci.* V. 32. P. 356.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012>
- Harris R.A.* 2017. Cerebral lactate metabolism and memory: Implications for Alzheimer's disease. *Electronic Thesis and Dissertation Repository.* P. 4529.
- Hashimoto T., Hussien R., Oommen S., Gohil K., Brooks G.A.* 2007. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J.* V. 21. P. 2602.  
<https://doi.org/10.1096/fj.07-8174com>
- Hui S., Ghergurovich J.M., Morscher R.J., Jang C., Teng X., Lu W., Esparza L.A., Reya T., Le Z., Yanxiang Guo J., White E., Rabinowitz J.D.* 2017. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature.* V. 551. P. 115.  
<https://doi.org/10.1038/nature24057>
- Jin N., Qian W., Yin X., Zhang L., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong C.-X., Liu F.* 2013. CREB regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: a possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* V. 41. P. 3240.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1227>
- Koenig M.K.* 2008. Presentation and diagnosis of mitochondrial disorders in children. *Pediatr. Neurol.* V. 38. P. 305.  
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol>
- Liguori C., Chiaravalloti A., Sancesario G., Stefani A., Sancesario G.M., Mercuri N.B., Schillaci O., Pierantozzi M.* 2016. Cerebrospinal fluid lactate levels and brain [18F]FDG PET hypometabolism within the default mode network in Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* V. 43. P. 2040.  
<https://doi.org/10.1007/s00259-016-3417-2>
- Liguori C., Stefani A., Sancesario G., Sancesario G.M., Marciani M.G., Pierantozzi M.* 2015. CSF lactate levels,  $\tau$  proteins, cognitive decline: a dynamic relationship in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* V. 86. P. 655.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308577>
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X.* 2013. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* V. 90. P. 199.  
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.004>
- Lu W., Huang J., Sun S., Huang S., Gan S., Xu J., Yang M., Xu S., Jiang X.* 2015. Changes in lactate content and monocarboxylate transporter 2 expression in A $\beta_{25-35}$ -treated rat model of Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* V. 36. P. 871.  
<https://doi.org/10.1007/s10072-015-2087-3>
- Mohamed A., Posse de Chaves E.* 2011. A $\beta$  internalization by neurons and glia. *Int. J. Alzheimers Dis.* P. 127984.  
<https://doi.org/10.4061/2011/127984>
- Moreira T.J., Pierre K., Maekawa F., Repond C., Cebera A., Liljequist S., Pellerin L.* 2009. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 29. P. 1273.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.50>
- Mosconi L., Mistur R., Switalski R., Tsui W.H., Glodzik L., Li Y., Pirraglia E., De Santi S., Reisberg B., Wisniewski T., de Leon M.* 2009. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *J. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* V. 36. P. 811.  
<https://doi.org/10.1007/s00259-008-1039-z>
- Muraleedharan R., Gawali M.V., Tiwari D., Sukumaran A., Oatman N., Anderson J., Nardini D., Bhuiyan M.A.N., Tkáč I., Ward A.L., Kundu M., Waclaw R., Chow L.M., Gross C., Rao R., Schirmeier S., Dasgupta B.* 2020. AMPK-Regulated Astrocytic lactate shuttle plays a non-cell-autonomous role in neuronal survival. *Cell Rep.* V. 32. P. 108092.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108092>



- Nagase M., Takahashi Y., Watabe A.M., Kubo Y., Kato F. 2014. On-site energy supply at synapses through monocarboxylate transporters maintains excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* V. 34. P. 2605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4687-12.2014>
- Newman L.A., Korol D.L., Gold P.E. 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One.* V. 6. P. e28427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028427>
- Nielsen H.M., Veerhuis R., Holmqvist B., Janciauskiene S. 2009. Binding and uptake of A beta1-42 by primary human astrocytes in vitro. *Glia.* V. 57. P. 978. <https://doi.org/10.1002/glia.20822>
- Pérez-Escuredo J., Van Hée V.F., Sboarina M., Falces J., Payen V.L., Pellerin L., Sonveaux P. 2016. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1863. P. 2481. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.013>
- Pierre K., Pellerin L. 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* V. 94. P. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x>
- Pinheiro C., Longatto-Filho A., Azevedo-Silva J., Casal M., Schmitt F.C., Baltazar F. 2012. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 44. P. 127–139. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9428-1>
- Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. 2015. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* V. 64. P. 174. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.005>
- Shin B.K., Kang S., Kim D.S., Park S. 2018. Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in Alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). V. 243. P. 334. <https://doi.org/10.1177/1535370217751610>
- Shin Y., Choi S.H., Kim E., Bylykbashi E., Kim J.A., Chung S., Kim D.Y., Kamm R.D., Tanzi R.E. 2019. Blood-brain barrier dysfunction in a 3D in vitro model of Alzheimer's disease. *Adv. Sci.* V. 6. P.1900962. <https://doi.org/10.1002/advs.201900962>
- Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. 2007. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci.* V. 147. P. 28. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.011>
- Suzuki A., Stern S.A., Bozdagi O., Huntley G.W., Walker R.H., Magistretti P.J., Alberini C.M. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell.* V. 144. P. 810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>
- Tadi M., Allaman I., Lengacher S., Grenningloh G., Magistretti P.J. 2015. Learning-induced gene expression in the hippocampus reveals a role of neuron-astrocyte metabolic coupling in long term memory. *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0141568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141568>
- Tang B.L. 2018. Brain activity-induced neuronal glucose uptake/glycolysis: is the lactate shuttle not required? *Brain Res. Bull.* V. 137. P. 225. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.010>
- Wang Y., Shang Y., Mishra A., Bacon E., Yin F., Brinton R. 2020. Midlife chronological and endocrinological transitions in brain metabolism: system biology basis for increased Alzheimer's risk in female brain. *Sci. Rep.* V. 10. P. 8528. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65402-5>
- Yamanishi S., Katsumura K., Kobayashi T., Puro D.G. 2006. Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* V. 290. P. 925H. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01012.2005>
- Zhang M., Cheng X., Dang R., Zhang W., Zhang J., Yao Z. 2018. Lactate deficit in an Alzheimer disease mouse model: the relationship with neuronal damage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* V. 77. P. 1163. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly102>

## Disturbance in Expression of Lactate Transporters in Brain Cells under Acute Toxic Effect of Beta-Amyloid *In Vitro* and *In Vivo*

Ya. V. Gorina<sup>a,\*</sup>, E. V. Kharitonova<sup>a</sup>, E. D. Khilazheva<sup>a</sup>, A. A. Semenova<sup>a</sup>, A. V. Morgun<sup>b</sup>, Yu. K. Komleva<sup>a,c</sup>, O. L. Lopatina<sup>b</sup>, and A. B. Salmina<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

<sup>b</sup>Department of Outpatient Pediatrics and Propaedeutics of Childhood Diseases with a Postgraduate Course, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

<sup>c</sup>Center for Collective Use Molecular and Cellular Technologies, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

<sup>d</sup>Laboratory of Neurobiology and Tissue Engineering, Brain Institute, Scientific Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia  
\*e-mail: yana\_20@bk.ru

Decreased energy metabolism in the brain correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. Accumulating experimental data indicate that lactate transporters and monocarboxylate transporters (MCTs) are directly involved in cerebral energy metabolism. However, to date, changes in lactate levels and MCT content in Alzheimer's disease remain unclear. The aim of the study was to study the content of lactate and of its transporters – MCT1 and MCT2 in cells of neuronal, astroglial and endothelial nature under acute toxic effects of beta-amyloid (Aβ1–42) in

vitro and in vivo. Under conditions of acute toxic action of A $\beta$ 1–42 in vivo, a significant ( $P \leq 0.05$ ) decrease in the level of lactate in the hippocampal tissue and an increase ( $P \leq 0.05$ ) in the dialysate were found. At the same time, a low ( $P \leq 0.05$ ) levels of MCT1 and MCT2 was set. In vitro, significantly high ( $P \leq 0.05$ ) production of lactate by astrocytes was revealed, coupled with low ( $P \leq 0.05$ ) level of MCT2 on neurons. Thus, it was found that A $\beta$ 1–42 causes a decrease in the level of lactate in the hippocampal tissue and an increase in its level in dialysate in vivo, which correlates with the impaired level of MCT1 and MCT2. This indicates a violation of energy metabolism due to the acute toxic effect of A $\beta$ 1–42. At the same time, the revealed increase in the production of lactate by astrocytes in vitro may indicate the inclusion of a compensatory mechanism aimed at maintaining the astrocyte-neuronal interaction.

*Keywords:* Alzheimer's disease, lactate, MCT, energy metabolism