

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

06.03.01.07 Биофизика

Ангиогенез при повреждении мозга и болезни Альцгеймера

Научный руководитель _____

подпись, дата

д.м.н. Н.А. Малиновская

ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник ББ17-31Б _____

подпись, дата

Л.А. Тюленева

инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалифицированная работа на тему «Ангиогенез при повреждении мозга и болезни Альцгеймера» содержит 34 страницы текстового документа, 25 использованных источников.

Ключевые слова: АНГИОГЕНЕЗ, АЛЬЦГЕЙМЕР, ИШЕМИЯ, ДЕМЕНЦИЯ, ФЛУОРЕСЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ТЕСТЫ, ИММУНОГИСТОХИМИЯ. Цель исследования - оценка изменений ангиогенеза у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера и ишемией головного мозга.

Моделирование болезни Альцгеймера (БА) проходило на крысах возрастом по 8 месяцев с однократным введением бета-амелоида или физиологического раствора, а также моделирование ишемии головного мозга проходило на крысах возрастом по 2 месяца. Оценка изменений в поведении животных проводилась с помощью поведенческих тестов – NSS-тест, «открытое поле» и «водный лабиринт Морриса», проводились иммуногистохимия на свободно-плавающих срезах и флуоресцентная микроскопия. В результате исследования выявлены выраженный неврологический дефицит, что свидетельствует о развитии острой и хронической нейродегенерации и усиление ангиогенеза у экспериментальных групп моделей БА и ишемии головного мозга, что может свидетельствовать о репарации повреждения.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1.1 Ангиогенез.....	7
1.2 Механизмы	7
1.3 Навигационные рецепторы	8
1.4 VEGF	8
1.5 HIF	11
1.6 Компоненты межклеточного матрикса.....	12
1.7 Ангиогенез при ишемии головного мозга.....	13
1.8 Дисфункция ангиогенеза при болезни Альцгеймера	14
1.9 Защитные эффекты физических упражнений.....	14
2. Материалы и методы	16
2.1 Объект исследования.....	16
2.3 Тестирование животных.....	16
2.3.1 NSS-тест	16
2.3.2 «Открытое поле»	17
2.3.3 «Водный лабиринт Морриса».....	18
2.4 Подготовка материала и приготовление срезов	19
2.4 Иммуногистохимическое исследование.....	19
2.5 Статистический анализ.....	21
3. Результаты и обсуждение	22
3.1 Результаты тестов	22
3.1.1 Тест «Открытое поле».....	22

3.1.2 NSS-тест	24
3.1.2 Тест «Водный лабиринт Морриса».....	25
3.2 Результаты иммуногистохимии.....	26
3.2.1 Экспрессия VEGF	26
3.2.1 Экспрессия VEGFR.....	27
3.2.2 Экспрессия CD31	28
3.2.3 Экспрессия PgP	29
3.3 Корреляционный анализ.....	30
4. Заключение	32
5. Список литературы	33

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА) и ишемия головного мозга, заметно возрастает с возрастом. Ежегодно в России поражается более 450 000 человек. В течение последнего десятилетия произошел концептуальный сдвиг в области болезни Альцгеймера, рассматривающей болезнь как континуум. Хотя наиболее широко убедительной гипотезой для этиологии болезни Альцгеймера является гипотеза амилоидного каскада, все больше данных свидетельствуют о том, что ангиогенез может представлять собой новый патогенный механизм, участвующий в прогрессировании БА. Ангиогенез - это формирование и ремоделирование новых кровеносных сосудов и капилляров из существующей сосудистой сети посредством взаимодействия между клеточным матриксом, цитокинами и протеазами. Он играет ключевую роль в диффузионном обмене метаболитов и питательных веществ во всех тканях и органах человеческого тела, происходящие на протяжении всей нашей жизни как в болезненном, так и в здоровом состоянии. Изменения метаболизма приводят к пропорциональным изменениям ангиогенеза и, следовательно, пропорциональным изменениям капиллярности. Кислород имеет решающее значение для этого процесса. Гипоксия возникает при снижении подачи кислорода или повышении потребности в кислороде. Это основной физиологический стимул для индукции ангиогенеза, который обеспечивает путь стимул-ответ, который пытается поддерживать адекватную оксигенацию при патологическом статусе. В последние десятилетия наблюдается большой интерес к регуляции ангиогенеза как терапевтической мишени при раке и ишемическом инсульте. [1,2].

Цель исследования: оценка изменений ангиогенеза у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера и ишемией головного мозга.

Задачи:

1. Обозначить и выяснить сходство поведенческих изменений при болезни Альцгеймера и ишемии головного мозга.
2. Выявить особенности ангиогенеза у модельных животных.
3. Провести корреляционный анализ выраженности поведенческих изменений с изменением экспрессии маркеров ангиогенеза.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Ангиогенез

Ангиогенез играет решающую роль в эмбриогенезе и созревании сердечно-сосудистой системы. Сердечно-сосудистая система - это первый орган, формирующийся во время развития позвоночных. Эта сложная сосудистая сеть обеспечивает питание и поддержку иммунной системы различным тканям. У примитивных животных, таких как плодовая муха *Drosophila melanogaster* и червь *Caenorhabditis elegans*, кислород распространяется через кожу ко всем клеткам их тела. В ходе эволюции животные стали более сложными и крупными. Как правило, современные многоклеточные животные имеют низкое отношение площади поверхности к объему, что делает невозможным распределение необходимого кислорода и других питательных веществ с помощью простой диффузии. Поскольку диффузия кислорода ограничена толщиной примерно 100–200 мкм, всем многоклеточным животным за пределами этого размера необходимо рекрутировать кровеносные сосуды путем ангиогенеза, чтобы кислород и питательные вещества могли распределяться по их клеткам. Многие клетки с разными свойствами и происхождением, а также многочисленные небольшие ангиогенные молекулы участвуют в этом строго регулируемом процессе [1,3].

1.2 Механизмы

Существует два основных типа ангиогенеза: прорастающий ангиогенез и инвагинальный ангиогенез. При прорастании ангиогенеза ферментативная деградация базальной мембраны капилляров ослабляет взаимодействие эндотелиальная клетка-клетка, что позволяет эндотелиальным клеткам пролиферировать и прорасти в направлении ангиогенного стимулятора. На этой стадии эндотелиальные клетки уплощаются, образуя длинную, тонкую, суживающуюся псевдоподию, называемую филоподиями; это структуры с сильно расширенным эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом

Гольджи, с высоким уровнем продукции протеолитических ферментов. Протеолитические ферменты, секретируемые филоподиями, расщепляют внеклеточный матрикс и открывают путь для развивающегося ростка. С другой стороны, инвагинальный ангиогенез не зависит от пролиферации или миграции эндотелиальных клеток. В этом типе ангиогенеза, который считается быстрым ангиогенезом по сравнению с прорастающим ангиогенезом, существующий сосуд разделяется на два новых сосуда только в результате клеточной реорганизации. [4].

1.3 Навигационные рецепторы

Факторы, регулирующие прорастания сосудов, по своей природе можно разделить на биохимические и химические. Биохимические факторы включают артериальное давление, растяжение сосудистой стенки, трансэндотелиальный ток жидкости. Биохимические факторы меняют экспрессию генов и регулируют миграцию и секрецию ими химических ангиогенных факторов. Описано множество химических сигналов, регулирующих прорастания сосудов, которые включают ряд биологически активных веществ и метаболитов. Биологически активные вещества, влияющие на прорастание сосудов, в зависимости от эффекта делятся на стимуляторы и ингибиторы. Семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) стимулирует рост сосудов, в первую очередь VEGF-A, близкородственные факторы роста плаценты (PlGF-1,2), основной фактор роста фибробластов (FGF2), ангиопоэтин (ANGPT-1,2), интерлейкин-8 (IL-8), факторы роста тромбоцитов (PDGF) и другие. Описано достаточно много биологически активных веществ, подавляющих прорастание кровеносных сосудов. Более исследованными ингибиторами являются тромбоспондин-1,2, вазогибин-1, ангиостатины и другие [5,6].

1.4 VEGF

VEGF был идентифицирован, выделен и клонирован более 25 лет назад. Хотя VEGF в основном нацелен на эндотелиальные клетки, было

показано, что этот фактор оказывает множественное влияние на дополнительные типы клеток. Хотя VEGF необходим для физиологического сосудистого гомеостаза в различных клетках и тканях, было продемонстрировано, что он важен в молекулярном патогенезе роста и метастазирования опухоли. Патогенные эффекты, опосредованные VEGF, в первую очередь обусловлены его влиянием на проницаемость сосудов и неоангиогенез (неоваскуляризация). По сравнению с другими ангиогенными факторами, семейство фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) считается преобладающим в сосудистых новообразованиях. Белки семейства VEGF – это гликопротеины, которые стимулируют образование новых кровеносных и лимфатических сосудов, а также повышают их проницаемость. VEGF выводится в виде ковалентно связанных гомодимеров, стабилизированных дисульфидными мостиками. Семейство включает такие факторы роста как: VEGF-A; VEGF-B; VEGF-C; VEGF-D; VEGF-E и фактор роста плаценты (PLGF). Одним из активаторов VEGF является фактор, индуцированный гипоксией (HIF-1). Факторы семейства VEGF взаимодействуют с клеткой через рецепторную тирозинкиназу. Рецептор VEGF 1-го типа (VEGFR1, Flt-1) экспрессируется гемопоэтическими стволовыми клетками, моноцитами, макрофагами и эндотелиальными клетками сосудов. Рецептор VEGF 2-го типа (VEGFR-2, Flk-1 / KDR) экспрессируется кровью и лимфатическими эндотелиальными клетками, а рецептор VEGF 3-го типа (VEGFR-3, Flt-4) – эндотелиальными клетками лимфатических сосудов [7].

VEGF-A связывается с VEGFR-1 и VEGFR-2, тогда как PLGF и VEGF-B связываются только с VEGFR-1. VEGF-C и VEGF-D сначала связываются с VEGFR-3, а затем с VEGFR-2. Белки семейства VEGF также связываются с ко-рецепторами (нейтрофилы), трансмембранными непротеиновыми корецепторами тирозинкиназы для семейств семафориновых аксонов и VEGF. Взаимодействие между VEGF и рецептором активирует остаток тирозина во внутрицитоплазматической части рецептора и начинает работу

различных сигнальных каскадов в эндотелиальных клетках, таких как пролиферация, миграция и повышенная проницаемость сосудов. Фактор роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A). VEGF-A экспрессируется гладкомышечными клетками сосудов, макрофагами и опухолевыми клетками. Содержание кислорода в тканях - важный регулятор экспрессии VEGF-A. VEGF-A является одним из основных медиаторов ангиогенеза: альтернативное слияние мРНК дает 5 изоформ белков VEGF-A со 121, 145, 165, 189 и 206 аминокислотными остатками с различными функциями. Растворимые изоформы VEGF121 и VEGF145 способствуют ангиогенезу, регулируют проницаемость сосудов и способствуют пролиферации эндотелиальных клеток. VEGF189 и VEGF206 вызывают пролиферацию «активного» эндотелия. С одной стороны, VEGF является сосудистым протектором, который действует, стимулируя образование оксида азота, опосредует антиапоптотический эффект, способствует выживанию эндотелия и усиливает его антитромботические и противовоспалительные свойства. С другой стороны, увеличение содержания VEGF увеличивает проницаемость стенки сосуда и способствует развитию отека. Предыдущие исследования показали, что у почти здоровых людей средняя сывороточная концентрация С-реактивного белка (CRP) и хемокина, белка, который способствует миграции макрофагов (MSP-1), VEGF значительно ниже в возрастной группе от 21 года до 40 лет, нежели в возрастной группе от 41 до 60 лет. При этом наблюдается увеличение содержания VEGF в плазме крови. Повышенные уровни в сыворотке сигнальных молекул, таких как CRP и хемокин MSP-1, тесно связаны с пожилым возрастом. Снижение уровней VEGF в сыворотке и плазме можно рассматривать как один из маркеров отсутствия механизмов ангиогенеза, приводящего к медленному прогрессированию церебральной ишемии и увеличению неврологического дефицита [8,9,10].

1.5 HIF

Изменения в подаче кислорода представляют собой основной физиологический стимул для всех эукариотических клеток, которым требуется адекватное потребление кислорода для внутриклеточных метаболических реакций. Помимо своего вклада в поддержание внутриклеточной биоэнергетики за счет выработки митохондриального АТФ, O_2 также служит универсальным акцептором электронов в различных биохимических путях. Следовательно, гены, участвующие в реакции на гипоксию, высоко консервативны в процессе эволюции. HIF-1 представляет собой кислород-зависимый активатор транскрипции, который состоит из HIF-1 α , альфа-субъединицы, и ядерного транслокатора арилуглеводородного рецептора (Arnt), бета-субъединицы. Обе субъединицы принадлежат к семейству bHLH-PAS (Per / Arnt / Sim). HIF-1 индуцируется в гипоксических клетках и связывается с цис-действующим элементом ответа на гипоксию (HRE) гена человека, который необходим для синтеза эритропоэтина. Уровни внутриклеточной концентрации кислорода могут влиять на субклеточную локализацию и активность белка субъединицы HIF-1 α , тогда как экспрессия HIF-1 β не регулируется уровнем. Субъединицы HIF-1 α и HIF-1 β похожи по структуре, и обе содержат два домена PAS. Домены bHLH и PAS имеют решающее значение для образования гетеродимеров HIF-1 α и HIF-1 β и для связывания ДНК. Субъединица HIF-1 α содержит N-концевые домены трансаактивации (TAD-N) и C-концевые домены трансаактивации (TAD-C), сцепленные с помощью ингибиторного домена. TAD-N непрерывен со стабильностью белка, который перекрывается с доменом кислородзависимой деградации (ODD). TAD-C не зависит от стабильности белка, который взаимодействует с p300 / CBP и имеет решающее значение для активности транскрипции. Белок HIF-1 α нестабилен (период полураспада = 5 мин) и модифицируется различными посттранскрипционными регуляторами, включая фосфорилирование, гидроксилирование, убиквитинирование, ацетилирование и нитрозирование. Фактор, ингибирующий HIF-1 (FIH-1),

гидроксилирует аспарагин-803 HIF-1 α в TAD-C в нормоксических условиях, что ингибирует взаимодействие HIF-1 α с коактиваторами транскрипции. Молекулярные механизмы ключевой роли HIF-1 в регуляции ангиогенеза были выявлены в последние годы путем модуляции проангиогенных хемокинов и рецепторов (SDF-1 α , сфингозин-1-фосфат, фактор 1 α , полученный из стромальных клеток, рецептор CXCR4, сфингозин-1-фосфатные рецепторы и хемокиновый рецептор CXCR4 типа 4), тем самым способствуя рекрутированию эндотелиальных клеток. В общем, модификации HIF-1 быстро и точно регулируются в соответствии с концентрацией кислорода в клетке посредством множественной передачи сигналов. Ангиогенез, индуцированный гипоксией, представляет собой очень сложный и управляемый процесс при заболевании человека. Было обнаружено, что HIF-1 является основным модулятором индуцированного гипоксией ангиогенеза за счет синергических корреляций с различными проангиогенными факторами и регулирует многие гены, которые играют важную роль в ангиогенезе. Таким образом, модуляция HIF-1 может иметь терапевтические преимущества при различных патологиях гипоксии, включая заболевания с высокими показателями смертности [1,11,12].

1.6 Компоненты межклеточного матрикса

Проращение ангиогенеза, при котором эндотелиальные клетки кровеносных сосудов локально пролиферируют, зарождаются и образуют ответвляющиеся сосуды от главного сосуда, представляет собой инвазивный процесс, инициируемый множественными матриксными металлопротеиназами (ММП). Эти ферменты разрушают белки внеклеточного матрикса, позволяя эндотелиальным клеткам сосудов проникать в ткань и образовывать отростки сосудов. Структура всех ММП представлена сигнальным пептидом, необходимым для успешного выведения из клетки; сайт пропептида, при расщеплении которого активируется ММП. Активность ферментов зависит от уровня экспрессии их генов и от

присутствия, как активаторов, так и ингибиторов. ММП называются «индуцибельными ферментами», на транскрипцию которых влияет ряд факторов (стероидные и тироидные гормоны, цитокины, факторы роста, химические вещества и т. Д.). Основная биологическая функция ММП - удаление компонентов внеклеточного матрикса. Металлопротеиназы продуцируются нормальными или трансформированными клетками: нейтрофилами, моноцитами, макрофагами и др. Модель мышц с дефицитом MMP9 показала, что фермент является основным регулятором ангиогенеза и апоптоза хондроцитов [13,14].

1.7 Ангиогенез при ишемии головного мозга

Ишемия - это патологическое состояние, говорящее об относительном нарушении кровоснабжения миокарда из-за повреждения коронарных артерий. В процессах ангиогенеза он является основным фактором роста фибробластов (bFGF). В ткани мозга он экспрессируется в цитоплазме нейронов и эндотелиальных клеток. Прием экзогенного фактора способствует местной перфузии, защищает клетки от токсического воздействия окислительного стресса и ограничивает область ишемического некроза. Исследования показали, что в области ангиогенеза, стимулированного bFGF, наблюдается увеличение количества активно функционирующих микрососудов в среднесрочной и долгосрочной перспективе. Ангиогенный эффект фактора способствует пролиферации и регулирует миграцию активированных эндотелиальных клеток и перицитов. Длительное участие bFGF в этих процессах подтверждается данными о содержании эндогенного сывороточного bFGF у больных с инсультом. Использование низких доз нитроаргинина во время экспериментальной окклюзии артерии среднего мозга ограничивает область ишемического инсульта у крыс, тогда как высокие дозы ингибиторов нитроксидсинтазы, напротив, усиливают очаг ишемии. Токсическое и защитное действие оксида

азота дополняют и противоречат друг другу как элементы одного и того же действия [15,16].

1.8 Дисфункция ангиогенеза при болезни Альцгеймера

VEGF может быть возможным медиатором, связывающим депрессию и деменцию, и может быть вовлечен в когнитивные нарушения при БА. Хорошо известно, что существуют ассоциации между психосоциальными стрессорами и депрессией. VEGF может быть получен из повышенного уровня норадреналина через бета-адренорецепторы, активируемые симпатическими путями. Установлено повышенное содержание VEGF в плазме крови у женщин, подвергающихся длительному психосоциальному стрессу. Повышенный уровень VEGF в сыворотке крови у пациентов с БА с депрессией может свидетельствовать о том, что пациенты с БА имеют более высокий психосоциальный стресс, связанный с депрессией, что может индуцировать активацию симпатической нервной системы [5,17].

1.9 Защитные эффекты физических упражнений

Эпидемиологические данные подтверждают обратную зависимость между количеством выполняемых физических нагрузок и риском развития этих двух заболеваний. Большинство продольных эпидемиологических исследований, в которых изучалась связь между РА и риском снижения когнитивных функций, подтверждают идею о том, что РА задерживает начало АД и деменции у пожилых людей. Метаанализ, проведенный в 2009 году, показал, что ПА снижает риск развития БА на 45% [0,55, 95% доверительный интервал (ДИ) = 0,36–0,84, $p = 0,006$]. Эта защитная роль ПА против БА определяется, по крайней мере, частично, зависимостью от дозы. В исследовании, посвященном популяционному риску БА в соответствии с выбранными факторами риска, установлено, что 12,7% и 20,3% случаев БА в мире и в Европе в 2010 году, соответственно, были связаны с отсутствием физической активности. Таким образом, данные наблюдательных исследований убедительно подтверждают, что РА является клинически

значимым вариантом профилактики АД. Физические упражнения, определяемые как повторяющиеся и целенаправленные ПА, обычно используемые для улучшения физиологических, физических и функциональных способностей, являются подтипом ПА, который также защищает от снижения когнитивных функций и БА. Американское исследование 1740 субъектов старше 65 лет показало, что частота деменции составляла 13,0 на 1000 человеко-лет для участников, которые занимались три или более раз в неделю (≥ 15 минут / сеанс ходьбы, езды на велосипеде, плавания, аэробики, эвритмии, акваробика, силовые тренировки, растяжка или другие виды деятельности) по сравнению с 19,7 на 1000 человеко-лет для тех, кто занимался менее трех раз в неделю. В когорте из 347 пожилых мужчин (в возрасте $74,6 \pm 4,3$ года, среднее значение \pm стандартное отклонение) когнитивное снижение, измеренное с помощью мини-обследования психического состояния (MMSE), было выше для лиц, которые выполняли ПА менее 1 часа в неделю, чем для тех, кто были значительно более активными. Продольное исследование, проведенное в Западной Европе (в Финляндии, Италии и Нидерландах) в течение 10-летнего периода, показало, что у субъектов ($n = 295$), которые уменьшили свое суточное количество или интенсивность ПА, наблюдалось снижение когнитивных способностей, которое было больше, чем у субъектов, которые поддерживали свою суточную дозу или интенсивность ПА. Физические упражнения являются мощным инструментом для замедления снижения физической и когнитивной функции у пациентов с БА. Снижение симптомов депрессии и даже смертности было зарегистрировано у пациентов с деменцией, участвующих в программах PE. Улучшения когнитивной функции были связаны с улучшениями поструральной и моторной функций в испытаниях с физической нагрузкой [18,19,20,21,22,23,24].

2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Для создания модели ишемии головного мозга брали крыс линии Wistar, самцов, в возрасте 2 месяцев. Опытная группа (модель ишемии головного мозга) – 1-сторонняя перевязка общей сонной артерии (ОСА). При моделировании кожу разводили в стороны. ОСА располагается между глубокими мышцами шеи в составе сосудисто-нервного пучка, и ее можно увидеть, отодвинув грудино-ключично-сосцевидную мышцу. ОСА отделяли от других элементов сосудисто-нервного пучка, а после этого под нее подводили лигатуры. Контрольная группа – ложно-оперированные животные. Ложная операция – дача наркоза и хирургический доступ с последующим ушиванием раны, но без перевязки ОСА (для исключения влияния наркоза и операционного стресса). Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС) [**Ошибка! Закладка не определена.**].

Крысы линии Wistar, самцы, в возрасте 8 месяцев, были разделены на две группы: опытная группа животных с экспериментальной БА после введения β -амилоида 1-42 (Sigma-Aldrich, USA) и контрольная группа ложно-оперированных животных после введения растворителя для бета-амилоида – фосфатно-солевого буфера (Sigma-Aldrich, USA). Животные содержались в клетках со свободным доступом к корму и воде при регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь и постоянной температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ [25].

2.3 Тестирование животных

2.3.1 NSS-тест

Стандартный неврологический тест, позволяющий исследовать в динамике состояния моторной, рефлекторной, координаторной и сенсорной функции до и после моделирования заболеваний ЦНС (в частности, ишемии головного мозга), наличие очаговой симптоматики повреждения мозга.

Определение неврологического статуса будет производиться по общепринятой шкале оценки неврологической тяжести (NSS), адаптированной для крыс. Этот тест оценивает возможности животного при выполнении 10 различных задач, которые оценивают основные рефлексы, его способность двигаться и сохранять равновесие. Один балл присуждается за невыполнение задания, поэтому нормальное здоровое животное должно получить 0 баллов по всем пунктам шкалы. Оценку неврологического дефицита животных проводят на 1-е сутки до моделирующих воздействий и 14-е сутки после моделирующих воздействий [25].

2.3.2 «Открытое поле»

Тест позволяет выявить нарушения спонтанной двигательной активности, вегетативных функций (например, учащение или урежение уриаций и дефекаций, изменение консистенции болюсов), нарушения эмоциональной реакции крыс (длительное замирание и снижение частоты груминга, об эмоциональности также можно судить по изменению дефекации у крыс и т.д.). Тестирование общей двигательной активности, экспериментально-исследовательской деятельности, эмоционального состояния животных проводят в условиях «открытой арены». Тест включает количественную оценку поведенческих компонентов животного, помещенного в новое открытое пространство, из которого стена, ограничивающая арену, препятствует его выходу. «Открытое поле» для крыс представляет собой серую арену площадью 1 м². Видеорегистрация отдельных поведенческих реакций животных осуществляется с помощью видеокамеры. С целью определения ориентировочно-исследовательской и двигательной активности крыс в течение 5 минут тестирования регистрируют следующие показатели:

- Горизонтальная двигательная активность, отражающая общую двигательную активность крыс. В этот параметр входит бег по разным путям, кружение вокруг одного места.

- Вертикальная двигательная активность, отражающая ориентировку и исследовательское поведение животных. Вертикальные стойки крепятся как с опорой, так и без нее.
- Для оценки эмоционального состояния крыс используются следующие показатели:
- Длительность реакции груминга: Груминг у грызунов представляет собой чрезвычайно распространенную форму поведения, выполняющую в организме ряд важных функций – уход за кожей и шерстью, терморегуляцию, распределение химических веществ.
- Короткий груминг характеризуется 1-2 быстрыми круговыми движениями лап вокруг носа и небольшой области около него, а длительный груминг характеризуется умыванием области глаз, заведением лап за уши.

Реакция груминга в эмоциогенных ситуациях является смешанной реакцией, отражающей наличие эмоционального напряжения. У грызунов груминг специфически активизируется при действии стресса [25].

2.3.3 «Водный лабиринт Морриса»

Данный тест позволяет оценить долговременную пространственную память, эквивалентную эпизодическую память, обучаемость. Оцениваемые параметры – время, которое требовалось крысе для достижения платформы, время нахождения крысой нового расположения платформы.

Испытательная установка представляла собой круглый бассейн со стенками высотой около одного метра, наполненный водой ($T 25 \pm 2 \text{ } ^\circ \text{C}$) с добавлением сухого молока для мутности. В арене на 5 см ниже уровня воды размещалась стеклянная платформа. Каждый день менялось месторасположение платформы определенной последовательности, кроме контрольного тестирования до и после операции, в эти дни платформу оставляли в позиции третьего испытания [**Ошибка! Залка не определена.,Ошибка! Залка не определена.**].

2.4 Подготовка материала и приготовление срезов

После операции, спустя 14 дней проводили контрольное тестирование, затем у животных осуществляли транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом (PFA) с забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение двух суток, после чего погружали в 25-30% раствор сахарозы. С помощью вибротома Thermo Scientific Microm HM 650 изготавливали срезы толщиной 50-80 мкм. После нарезки срезы помещались в планшеты с консервантом (PBS с азидом натрия).

2.4 Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимия является одним из наиболее распространенных методов изучения экспрессии антигенов на клетках. Принцип метода основан на взаимодействии антиген-антитело, что позволяет пометить клетку, на которой присутствует изучаемый антиген, какой-либо меткой. Флуоресцентная метка может связываться непосредственно с первичным антителом, которое базируется против белка-мишени (прямая иммунофлуоресценция), или же с вторичным антителом, которое, в свою очередь, распознает первичное антитело или соединение системы амплификации (непрямая иммунофлуоресценция), второй вариант является более специфичным, поэтому его и использовали в данном исследовании. После моделирования БА выполняли транскардиальную перфузию с 4% параформальдегидом (PFA) с последующим забором образцов головного мозга. Срезы толщиной получали с помощью Thermo Scientific Microm HM 650. После экспрессию маркеров изучали с помощью непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов. Образцы ткани окрашивали первичными и вторичными антителами. Визуализацию выполняли с использованием флуоресцентного микроскопа ZOE при стандартном увеличении. Обработка изображений выполнялась в ImageJ. Подсчитывали процент клеток, экспрессирующих тот или иной антиген, от

общего числа клеток, выявляемого по окраске ядер с помощью красителя DAPI.

Окраска произведена в 12-луночный планшетах. Все этапы окраски и промывки проводились с использованием шейкера. Протокол проведения иммуногистохимического исследования свободноплавающих срезов:

1. Трехкратная промывка срезов в Washingsolution (200 млPBS + 400 мкл 0.2% TritonX100) – 5 минут при комнатной температуре;
2. Блокирование неспецифического связывания Blockingsolution (500 мкл 1% TritonX100 + 6 мл 25% BSA + 50 мл) – 1 час при комнатной температуре;
3. Трехкратная промывка срезов по 5 минут в Washingsolution.
4. Инкубация с первичными антителами в разведении 1:500 в AB-solution (100 мкл 0,2% TritonX100 + 6 мл 25% BSA + 50 мл PBS) – ночь при 4° C;
5. Инкубация с первичными антителами – 2 часа при комнатной температуре;
6. Трехкратная промывка срезов в Washingsolution – 5 минут при комнатной температуре;
7. Инкубация с вторичными антителами – 2 часа при комнатной температуре;
8. Трехкратная промывка срезов в Washingsolution – 5 минут при комнатной температуре;
9. Перенос срезов на предметные стекла;
10. Нанесение на срезы монтирующей жидкости (30-50 мкл глицерина в PBS 1:1 + DAPI);
11. Фиксация срезов покровными стеклами;
12. Флуоресцентная микроскопия.

ZOE fluorescent Cell imager – система визуализации клеточных микропрепаратов в фазовом контрасте и трёх каналах флуоресценции (синий, зеленый, красный). ZOE позволяет делать высококачественные фотографии образцов, создавать совмещенное изображение препарата по нескольким каналам. Главным преимуществом является светозащитный экран,

позволяющий получать флуоресцентные изображения при окружающем освещении. В процессе флуоресцентной микроскопии исследовали экспрессию нейровоспалительных маркеров в трех областях: гиппокамп (главный центр консолидации памяти), энторинальная кора (входит в состав гиппокамповой формации) и миндалевидное тело (участвует в процессах формирования долгосрочной памяти).

2.5 Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью GraphPad Prism. Использовались U -критерий Манна–Уитни, односторонний дисперсионный анализ с последующим критерием множественного сравнения Даннета (*-индикация) или непарный t -критерий (#-индикация). Для проведения корреляционного анализа использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. $p < 0,05$ – уровень статистической значимости.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Результаты тестов

3.1.1 Тест «Открытое поле»

Анализ результатов теста «Открытое поле» (рисунок 1) показал, что до операции как в экспериментальной, так и в контрольной группах, животные имели нормальные показатели и наблюдалось возникновение исследовательского поведения, что говорит о наименьшем тревожно-поведенческом состоянии до оперативного вмешательства.

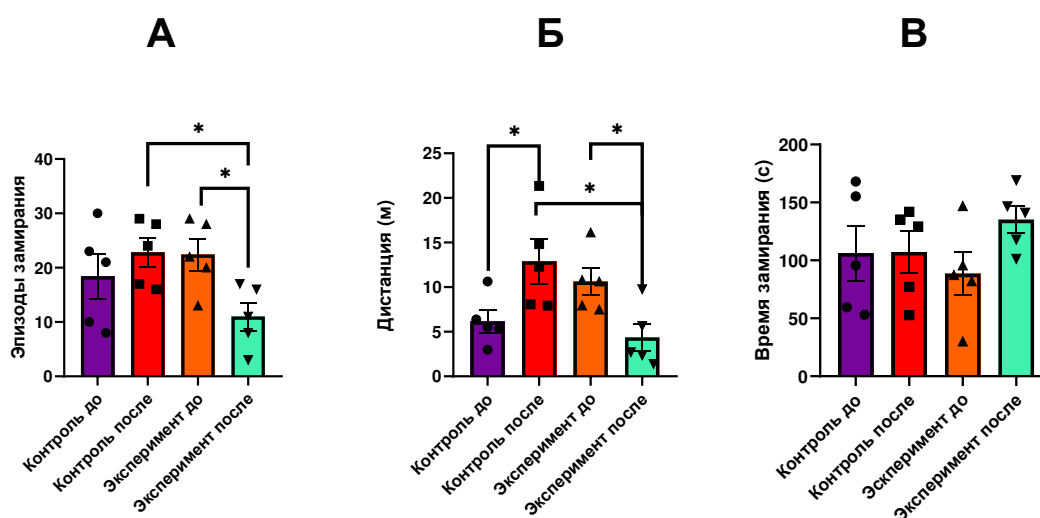


Рис.1 Результаты теста работы с Альцгеймером: А – число эпизодов, Б – пройденная дистанция (м), В - время замирания (с)

По результатам теста видно, что после введения бета-амилоида в экспериментальной группе наблюдается значимое снижение числа эпизодов замирания, когда время замирания наоборот, увеличивается.

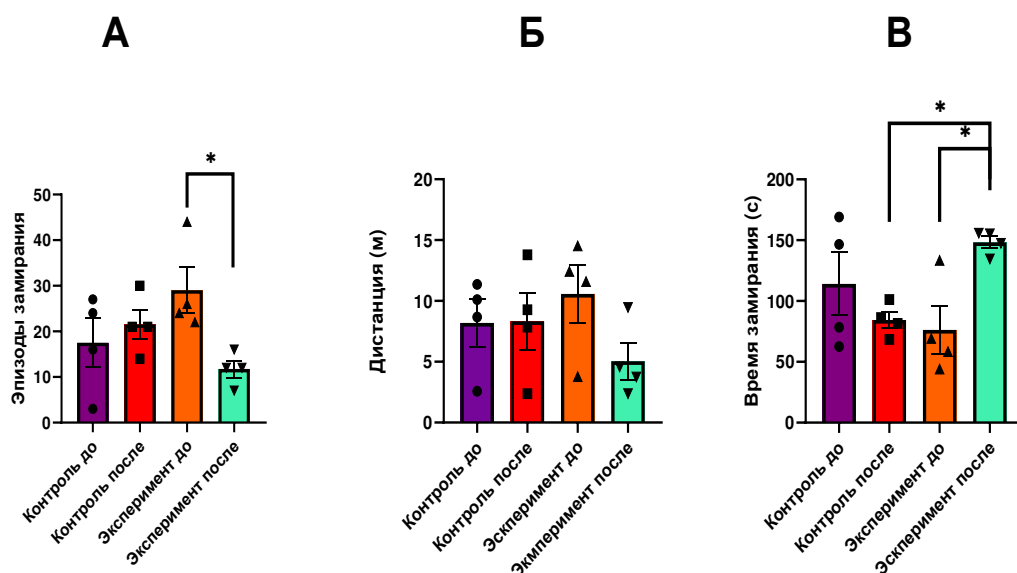


Рис.2 Результаты теста эксперимента по ишемии: А – число эпизодов ,
 Б – пройденная дистанция (м), В - время замирания (с)

Похожая ситуация наблюдается и в экспериментальной группе по моделированию ишемии, на графиках показывается, что число эпизодов уменьшается (рисунок 2, А) и время замирания (рисунок 2, В) увеличивается после операционного вмешательства, что говорит об уменьшении активности животного. Это свойственно для крыс, которые испытывают больший страх. Исходя из этих результатов предполагается, что экспериментальная группа подвержена тревожным состояниям и происходит усиление депрессия-подобного поведения, о чем также свидетельствует у них уменьшение пройденной дистанции (рисунок 2, Б).

3.1.2 NSS-тест

Анализ результатов NSS-теста (рисунок 2) показал, что у групп, как у моделей по ишемии головного мозга, так и у моделей по БА, наблюдается повреждение умеренной и средней степени выраженности, что исключает наличие выраженной неврологической симптоматики (рисунок 3).

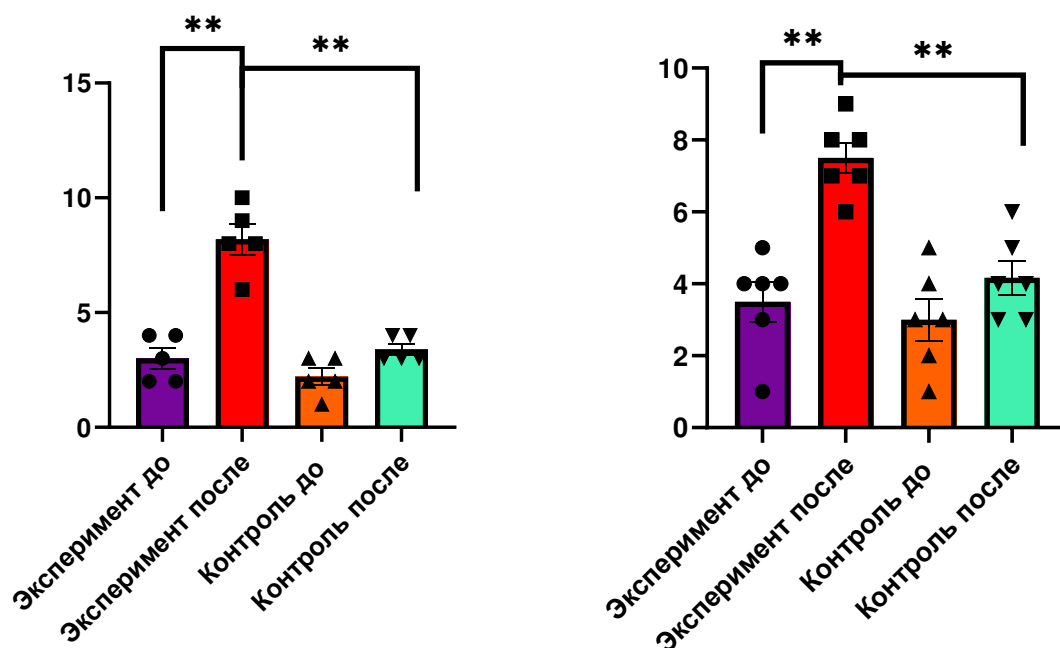


Рис.3 Неврологический дефицит (сумма баллов NSS тесте): А – по ишемии, Б – по Альцгеймеру

У животных экспериментальной группы после операции (рисунок 3, А) наблюдалась тенденция к увеличению суммы баллов в тесте по сравнению с контрольной группой, где статистическая значимость превышает 0,01. Также данные из графика (рисунок 3, Б) свидетельствуют о подобных результатах и в моделях БА, где экспериментальная группа имеет большие баллы по сравнению с результатами в группах контрольной до введения физ.раствора и экспериментальной до введения бета-амилоида, расхождения в основном были связаны только с изменениями равновесия.

3.1.2 Тест «Водный лабиринт Морриса»

До операции результаты в контрольных и экспериментальных группах животных (время нахождения платформы) находились в пределах нормы (до 15 секунд). Это означает, что долговременная пространственная память и эквивалентная эпизодическая память были в нормальном состоянии (рисунок 4) у обеих моделей.

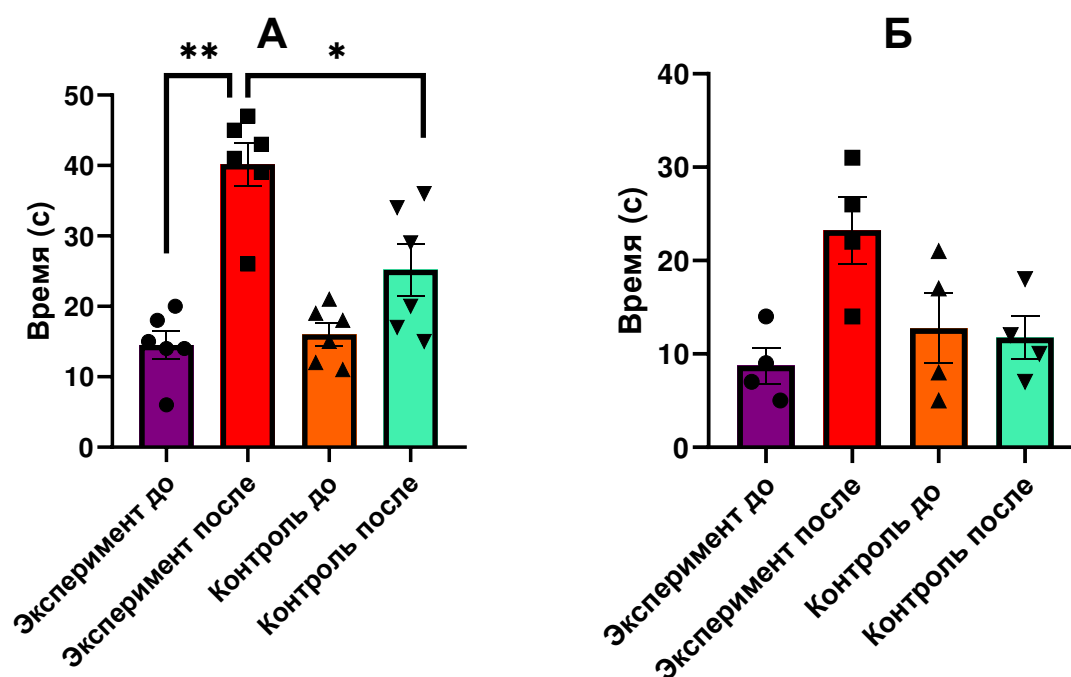


Рис.4 Время нахождения платформы: А – по Альцгеймеру, Б – по ишемии

И графика (рисунок 4, А и Б) наблюдается увеличение времени нахождения платформы в экспериментальных группах БА и ишемии головного мозга, что свидетельствует об ухудшении когнитивных функций у крыс. У контрольной группы модели БА это может быть связано с усилением депрессивно-поведенческого состояния после пережитой операции.

3.2 Результаты иммуногистохимии

3.2.1 Экспрессия VEGF

На рисунке 5 представлены результаты анализа экспрессии VEGF (сосудистого эндотелиального фактора роста). У экспериментальных групп наблюдался значимый ($\leq 0,005$ в модели БА, $\leq 0,001$ в модели ишемии головного мозга) рост процента позитивных клеток в гиппокампе, что может свидетельствовать об усилении ангиогенеза как при острой, так и при хронической нейродегенерации. Также процент экспрессирующих VEGF клеток возрастает у экспериментальной группы (рисунок 5, А) в миндалине.

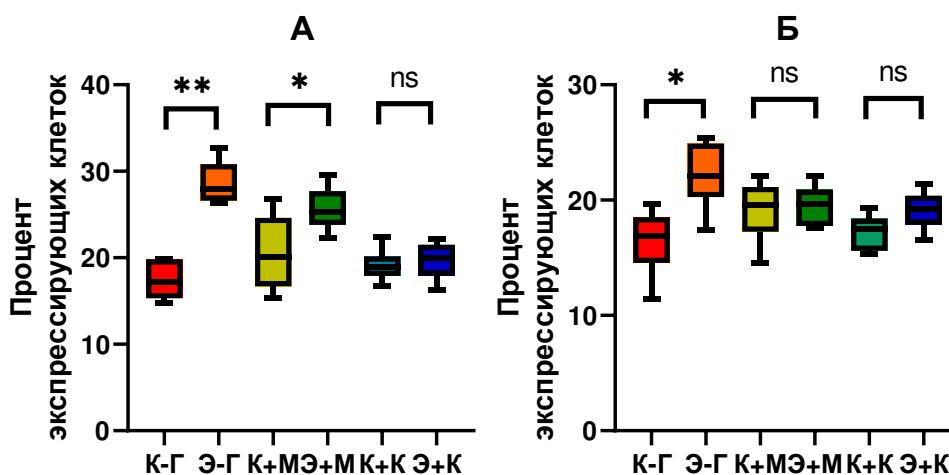


Рис. 5 Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии VEGF: А – модель БА, Б – модель ишемии головного мозга. К-Г – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; Э-Г – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; К-М – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в миндалине; Э-М – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в миндалине; К-К – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в коре; Э-К – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в коре.

3.2.1 Экспрессия VEGFR

На рисунке 6 показаны результаты анализа экспрессии VEGFR – рецептора к сосудистому эндотелиальному фактору роста. Из результатов видно, что обе группы в миндаляне и коре не имеют статистической значимости и стабильны, однако у экспериментальных групп наблюдается рост процента VEGFR-экспрессирующих клеток, что согласуется с предыдущими результатами о повышении экспрессии VEGF.

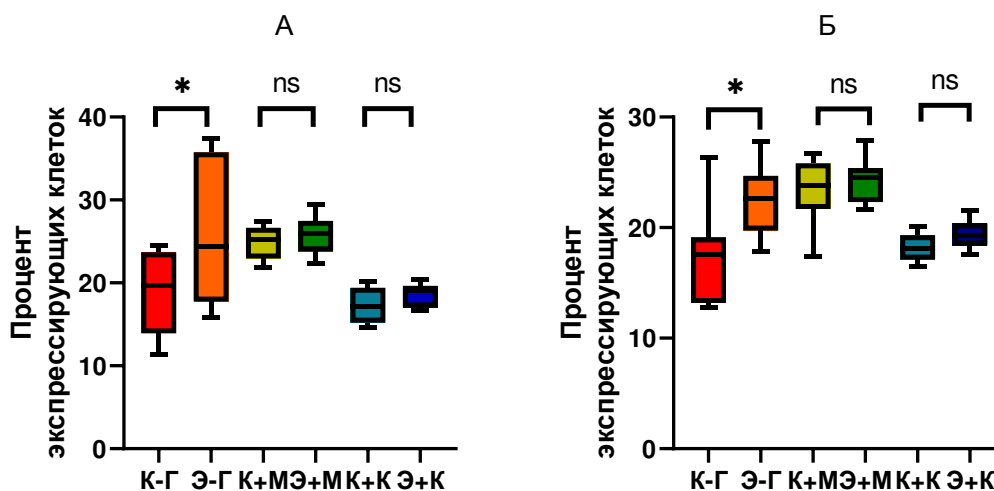


Рис. 6 Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии VEGFR: А – модель БА, Б – модель ишемии головного мозга. К-Г – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; Э-Г – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; К-М – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в миндаляне; Э-М – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в миндаляне; К-К – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в коре; Э-К – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в коре.

3.2.2 Экспрессия CD31

CD31 представляет собой гликопротеин, экспрессируемый на эндотелиальных клетках, тромбоцитах и некоторых лейкоцитах. CD31 конститутивно экспрессируется на эндотелиальных клетках, и его экспрессия не повышается цитокинами. Из полученных данных (рисунок 7) видно, что происходит значимый рост экспрессии клеток у экспериментальных групп в гиппокампе и миндалине.

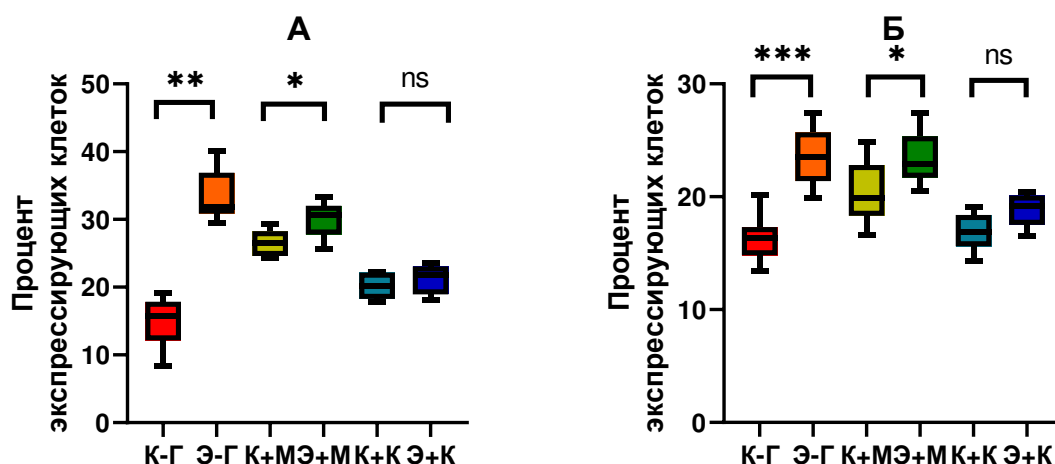


Рис 7. Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии CD31: А – модель БА, Б – модель ишемии головного мозга. К-Г – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; Э-Г – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; К-М – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в миндалине; Э-М – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в миндалине; К-К – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в коре; Э-К – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в коре.

3.2.3 Экспрессия PgP

Согласно литературным данным, положительная реакция на PgP используется для определения опухолевых заболеваний. Из результатов видно, что у экспериментальных групп экспрессия клеток значительно увеличивается и достигает наиболее выраженного значения в гиппокампе. Это может свидетельствовать о возможном усилении ангиогенеза.

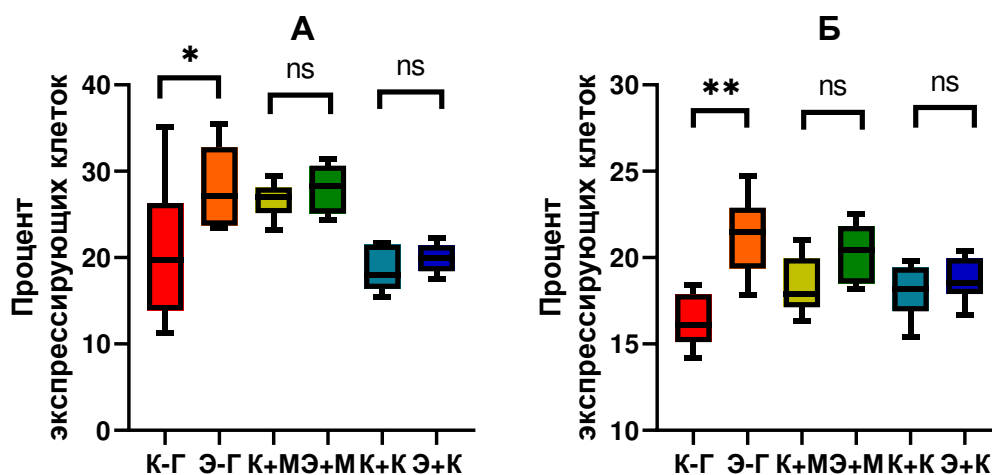


Рис. 8 Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии PgP: А – модель БА, Б – модель ишемии головного мозга. К-Г – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; Э-Г – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в гиппокампе; К-М – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в миндалине; Э-М – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в миндалине; К-К – контрольная группа, процент экспрессирующих клеток в коре; Э-К – экспериментальная группа, процент экспрессирующих клеток в коре.

Таким образом, в сравнении с контрольными группами, у экспериментальных групп наблюдается увеличение процента клеток, экспрессирующих маркеры ангиогенеза и/или эндотелия сосудов. Это может свидетельствовать об усилении ангиогенеза в указанных структурах

головного мозга при повреждении, однако наиболее значимые изменения наблюдались в гиппокампе, что согласуется с литературными данными об усилении нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа. Вероятнее всего, параллельно с нейрогенезом, происходит усиление и ангиогенеза.

3.3 Корреляционный анализ

В гиппокампе наблюдалось наиболее выраженное изменение экспрессии маркеров ангиогенеза и эндотелия сосудов, поэтому для корреляционного анализа были выбраны показатели этой структуры. В качестве коррелирующих маркеров были взяты VEGF и CD31, по этим меткам наблюдался наибольший процент экспрессирующих клеток. Результаты корреляционного анализа выраженности поведенческих изменений с изменением экспрессии рецепторов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты корреляционного анализа выраженности поведенческих изменений с изменением экспрессии VEGF и CD31.

Коррелирующие показатели	Коэффициент корреляции	Уровень значимости
Экспрессия VEGF и результаты водного лабиринта Морриса моделей БА – экспериментальная группа	0,569	$\leq 0,001$
Экспрессия VEGF и результатов NSS-теста у моделей БА – контрольная группа	0,967	$\leq 0,005$
Экспрессия VEGF и результатов NSS-теста у моделей моделей БА – экспериментальная группа	0,846	$\leq 0,005$
Экспрессия CD31 и результаты водного лабиринта Морриса моделей БА – экспериментальная группа	0,564	$\leq 0,001$
Экспрессия CD31 и результатов NSS-теста у моделей БА – контрольная группа	0,918	$\leq 0,005$
Экспрессия CD31 и результатов NSS-теста у моделей БА– экспериментальная группа	0,819	$\leq 0,005$
Экспрессия VEGF и результатов NSS-теста у моделей ишемии головного мозга – контрольная группа	0,477	$\leq 0,001$
Экспрессия VEGF и результатов NSS-теста у моделей ишемии головного мозга – экспериментальная группа	0,964	$\leq 0,005$

Экспрессия CD31 и результатов NSS-теста у моделей ишемии головного мозга – контрольная группа	0,808	$\leq 0,001$
Экспрессия CD31 и результатов NSS-теста у моделей ишемии головного мозга – экспериментальная группа	0,955	$\leq 0,001$
Экспрессия VEGF и результаты водного лабиринта Морриса моделей ишемии головного мозга – экспериментальная группа	0,887	$\leq 0,001$
Экспрессия CD31 и результаты водного лабиринта Морриса моделей ишемии головного мозга – экспериментальная группа	0,960	$\leq 0,001$

Выявлены множественные положительные значимые сильные корреляционные взаимосвязи между изменением экспрессии маркеров ангиогенеза в контрольной и экспериментальной группах и выраженностью поведенческих изменений как в модели острой, так и хронической нейродегенерации, что может свидетельствовать об усилении ангиогенеза (как одного из показателей репарации ткани) как следствия повреждения клеток при нейродегенерации.

4. Заключение

Были сделаны следующие выводы:

- 1) Было выявлено сходство поведенческих изменений при БА и ишемии головного мозга как примеров острой и хронической нейродегенерации: сходные изменения двигательной активности, наличие неврологического и когнитивного дефицита.
- 2) Во всех изученных структурах головного мозга было выявлено увеличение процента клеток, экспрессирующих рецепторы к VEGF, сам VEGF, маркеры эндотелия сосудов CD31 и PgP при острой и хронической дегенерации, в сравнении с контрольными группами, что может свидетельствовать об усилении ангиогенеза в указанных структурах головного мозга при повреждении, либо о выраженном разрушении сосудов при повреждении, однако наиболее выраженные изменения наблюдались в гиппокампе, что согласуется с литературными данными об усилении нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа.
- 3) Корреляционный анализ выраженности поведенческих изменений с изменением экспрессии маркеров ангиогенеза выявил сильную значимую положительную корреляционную взаимосвязь между процентом VEGF- и CD31-экспрессирующих клеток и результатами проведенных поведенческих тестов, что может указывать на весомый вклад процесса ангиогенеза в развитии и/или репарации повреждений ткани при острой и хронической нейродегенерации на примере моделей ишемии головного мозга и болезни Альцгеймера.

5. Список литературы

1. Liang W. et al. Multiscale modeling reveals angiogenesis-induced drug resistance in brain tumors and predicts a synergistic drug combination targeting EGFR and VEGFR pathways // *BMC bioinformatics*. – 2019. – A Vol.20(7). – P. 59-71.

2. Нефедова Н. А., Давыдова С. Ю. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – Т.3, №. 3. – С. 51-51.

3. Иванов А. Н., Пучиньян Д. М., Норкин И. А. Роль эндотелиальных клеток в ангиогенезе // *Успехи современной биологии*. – 2016. – Т. 136, №. 5. – С. 491-505.

4. Qin W. et al. Elevated plasma angiogenesis factors in Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2015. – A Vol.45(1). – P. 245-252.

5. Jung J. H. et al. The effect of depression on serum VEGF level in Alzheimer's disease // *Disease markers*. – 2015. – A Vol.21(5). – P. 1-5.

6. Щава С. П. Факторы роста сосудов и неоангиогенез при гипоксии и ишемии // *Дальневосточный медицинский журнал*. – 2007. – Т.6, №. 1. – С. 127-130.

7. Potente M., Gerhardt H., and Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis // *Cell*. – 2011. – A Vol.146(6). – P. 873-87.

8. Воскресенская О. Н. и др. Механизмы ангиогенеза в формировании структурных изменений ткани головного мозга у больных с прогрессирующими формами цереброваскулярных заболеваний // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2017. – Т. 117, №. 7. – С. 64-68.

9. Guo S., Colbert L.S., Fuller M., et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer // *Biochim Biophys Acta*. – 2010. – A Vol.106(1). – P. 108-21.

10. Gagliardi A.R., Hennig B., and Collins D.C. Antiestrogens inhibit endothelial cell growth stimulated by angiogenic growth factors // *Anticancer Res*. – 1996. – A Vol.16(3a). – P. 1101-6.

11. Semenza G.L. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1 // *J Appl Physiol* (1985). – 2004. – A Vol.96(3). – P. 1173-7

12. Powis G. and Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target // *Mol Cancer Ther*. – 2004. – A Vol.3(5). – P. 647-54.

13. Рубина К. А., Семина Е. В., Ткачук В. А. Навигационные молекулы и хемокины в процессах роста и ремоделирования сосудов // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. – 2017. – Т. 53, №. 5. – С. 313-327.

14. Потеряева О. Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний обзор литературы // *Journal of Siberian Medical Sciences*. – 2010. – Т.31, №. 5. – С. 11-21.

15. Калиниченко С. Г., Щава С. П., Матвеева Н. Ю. Ангиогенное и цитопротективное влияние основного фактора роста фибробластов в фокусе

экспериментальной церебральной ишемии //Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – №. 2 (36). – С. 66-69.

16. Merkulova-Rainon T. et al. Peripheral post-ischemic vascular repair is impaired in a murine model of Alzheimer's disease //Angiogenesis. – 2018. – A Vol.21(3). – P. 557-569.

17. Черток В. М., Захарчук Н. В., Черток А. Г. Клеточно-молекулярные механизмы регуляции ангиогенеза в головном мозге //Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. Спецвыпуски. – 2017. – Т. 117, №. 8. – С. 43-55.

18. Buchman A. S. et al. Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults //Neurology. – 2012. – A Vol.78(17). – P. 1323-1329.

19. Hamer M., Chida Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence //Psychological medicine. – 2009. – A Vol. 39(1). – P. 3-11.

20. Buchman A. S. et al. Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults //Neurology. – 2012. – A Vol.78(17). – P. 1323-1329.

21. Larson E. B. et al. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older //Annals of internal medicine. – 2006. – A Vol.144(2). – P. 73-81.

22. Schuit A. J. et al. Physical activity and cognitive decline, the role of the apolipoprotein e4 allele //Medicine & Science in Sports & Exercise. – 2001. – A Vol.33(5). – P. 772-777.

23. Van Gelder B. M. et al. Physical activity in relation to cognitive decline in elderly men: the FINE Study //Neurology. – 2004. – A Vol. 63(12). – P. 2316-2321.

24. Paillard T., Rolland Y., de Souto Barreto P. Protective effects of physical exercise in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a narrative review //Journal of clinical neurology (Seoul, Korea). – 2015. – A Vol.11(3). – P. 212-217.

25. Belozertseva I. V. et al. Postoperative changes in the behavior of rats after anesthesia with sevoflurane //Vestn. Anesteziologii I Reanimatologii. – 2017. – A Vol. 1(2). – P. 55-62.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк В.А. Кратасюк

«21» июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

06.03.01.07 Биофизика

Ангиогенез при повреждении мозга и болезни Альцгеймера

Научный руководитель Н.А. Малиновская

подпись, дата

д.м.н. Н.А. Малиновская

ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник ББ17-31Б Л.А. Тюленева 21.06.21

подпись, дата

Л.А. Тюленева

инициалы, фамилия

Красноярск 2021