

УДК 57.085.23

¹Ш.Н. Аскарова*, ^{1,2}А.К. Цой, ²Т.М. Шалахметова¹Центр Наук о Жизни, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана²Казахский Национальный Университет имени Аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

Рецептор конечных продуктов гликозилирования – потенциальная мишень для терапии болезни Альцгеймера

Объектом исследования являлись эндотелиальные клетки линии bEnd3 церебральных капилляров мышей. Цель исследования – изучение механизмов патологического действия бета амилоида на клеточные элементы гемато-энцефалического барьера и поиск потенциальных мишеней для терапии болезни Альцгеймера. В ходе исследования были использованы методы количественного иммунофлуоресцентного анализа и метод колокализации белков с использованием конфокальной микроскопии. В результате проведенных работ было показано, что бета-амилоид, присоединяясь к рецептору конечных продуктов гликозилирования (RAGE), инициирует активацию НАДФН оксидазы, приводящую, в свою очередь, к генерации активных форм кислорода, в то время как ингибитор RAGE азелнидипин способен нивелировать индуцированное бета-амилоидом образование свободных кислородных радикалов.

Ключевые слова: бета-амилоид, эндотелиоцит, RAGE, НАДФН оксидаза

Ш.Н. Асқарова, А.К. Цой, Т.М. Шалахметова

Гликозильденудің ақырлық өнім рецепторы – Альцгеймер ауруы терапиясының нысанасы

Зерттеудің максаты – бета амилоидтың гемато-энцефалиттік тосқауыл жасушаларының элементтеріне патологиялық әсерінің механизмдерін және Альцгеймер ауруының терапиясы үшін әлеуеттік нысана көздерін іздеу болып табылады. Зерттеу объектісі ретінде тышқандардың bEnd3 қылтамырларынан алынған эндотелиялық жасушалар қарастырылды. Зерттеулер барысында сандық иммунофлуоресценттік талдау және конфокалдық микроскопты пайдалана отырып ақуыздардың колокализациясын зерттеу әдістері қолданылды. Жасалынған зерттеулер нәтижесінде бета амилоидтың гликозильденудің ақырлық өнім рецепторымен (RAGE) байланысқа түсе отырып, НАДФ оксидазының белсенділігін индукциялайтыны, сол себептен оттегінің белсенді түрлерінің пайда болуына әкеліп соқтыратыны анықталды. Ал RAGE тежегіші азелнидипиннің бета – амилоидтың әсерінен оттегінің белсенді түрлерінің пайда болуын тоқтататыны анықталды.

Түйін сөздер: бета-амилоид, эндотелиоцит, RAGE, НАДФН оксидаза

Sh. Askarova, A. Tsoy, T. Shalakhmetova

Receptor for advanced glycation endproducts as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease

Objective of the research is studying of the pathological effects of beta-amyloid on cerebral endothelial cells (CECs) and identifying of potential therapeutic target for Alzheimer's disease. In this study, immortalized cerebral endothelial cells (bEnd3) were used. Methods of quantitative immunofluorescence microscopy (QIM) and confocal immunofluorescence microscopy of double immunofluorescence labeled proteins were applied. We demonstrated that A β binding to the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) on the CECs surfaces is resulted in NADPH oxidase complex assembling and subsequent ROS generation. We also found that RAGE inhibitor azelnidipin was capable of abrogating A β -induced ROS production.

Key words: beta-amyloid, endotheliocyte, RAGE, NADPH oxidase

Болезнь Альцгеймера (БА) является широко распространённым хроническим нейродегенеративным заболеванием, поражающим примерно 10% людей в возрасте 65 лет и почти

40% – в возрасте 80 лет и старше. Клинически БА выражается тяжелыми когнитивными расстройствами, такими как дефицит внимания, нарушение пространственной ориентации и речи,

прогрессирующей амнезией. На поздних стадиях у больных полностью утрачиваются навыки самообслуживания, способность передвигаться, говорить и понимать чужую речь. Уход за такими пациентами обходится развитым странам в астрономические суммы. Так, согласно статистике, 5,4 миллиона граждан США страдают болезнью Альцгеймера, и стоимость ухода за ними составляет 200 миллиардов долларов в год [1].

В Казахстане, также как и в других странах мира, на протяжении последних десятилетий происходит увеличивающееся старение населения. Согласно данным Агентства РК по статистике, к концу 2011 года процент людей в возрасте 65 лет и старше в Республике составлял 6.6 %. Учитывая тот факт, что всего Казахстан населяет 16.4 млн граждан, основываясь на данных мировой статистики, можно предположить, что не менее 110 000 человек преклонного возраста могут страдать болезнью Альцгеймера. Тем не менее, в Казахстане практически не проводятся исследования, посвященные данной тематике, и нет точных статистических данных по учету пациентов, страдающих этой тяжелой возрастной патологией.

На данный момент болезнь Альцгеймера находится в перечне заболеваний, против которых не разработано эффективных методов лечения. Проводимая терапия, как правило, носит симптоматический характер и направлена на уменьшение выраженности основных клинических синдромов. Это лечение включает в себя использование **препаратов, улучшающих синаптическую передачу**. Однако данная терапия приводит лишь к временному уменьшению выраженности клинической картины заболевания и не в состоянии влиять на **развитие нейродегенеративного процесса** в виду отсутствия этиотропной направленности.

Главная трудность в разработке эффективных методов лечения – **отсутствие окончательной теоретической модели развития этого заболевания**. На сегодня **основная гипотеза патогенеза** болезни Альцгеймера состоит в том, что под влиянием ряда факторов, главные из которых – старение организма и его генетическая предрасположенность, в головном мозге происходит нарушение метаболизма белка-предшественника бета-амилоида. **Отложения бета-амилоида (А β)** приводят к формированию сенильных бляшек, поражающих нервные клет-

ки и мелкие кровеносные сосуды. Дальнейший механизм нейрональной и сосудистой дисфункции до сих пор уточняется.

Существует большое количество данных, свидетельствующих о том, что у пациентов, страдающих БА, наблюдаются значительные структурно-функциональные изменения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и что дисфункция ГЭБ, в свою очередь, играет ведущую роль в развитии и прогрессировании болезни [2,3]. Недавние исследования показали, что **А β проникает** в церебральные эндотелиоциты через рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE) [4-7]. RAGE является мультилигандным рецептором клеточной поверхности, который в нормальных условиях экспрессируется в эндотелиоцитах головного мозга и в меньшем количестве в клетках микроглии и нейронах [6,7]. В то же самое время, у больных, страдающих БА, экспрессия RAGE увеличивается в несколько раз как в эндотелиоцитах, так и в астроцитах, микроглии и нейронах [6,7]. **Было продемонстрировано**, что связывание А β с RAGE инициирует транспорт А β через гематоэнцефалический барьер и увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов в церебральных эндотелиальных клетках [7-9]. **Тем не менее, патологические механизмы, лежащие в основе взаимодействия А β с RAGE на сегодняшний день исследованы недостаточно.**

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы явилось изучение роли RAGE в индуцированном бета-амилоидом образовании активных форм кислорода (АФК) в эндотелиальных клетках церебральных капилляров и оценка терапевтического потенциала ингибитора RAGE азелнидипина *in vitro*.

Материалы и методы

Клеточные культуры

В проекте использовалась клеточная линия bEnd3 эндотелиальных клеток церебральных капилляров мышей (American Tissue and Culture Collection). Клетки культивировались в DMEM с 10% содержанием BSA и 1% антибиотика/антигрибкового препарата при высокой влажности, 5% CO₂ и 37°C. Для оценки воздействия А β 42 на эндотелиальные клетки церебральных капилляров (ЭКЦК), клетки обрабатывались 5 мкМ олигомеризованного бета-амилоида в течение 2 часов. Олигомеры получали из мономерной формы А β 42 производства компании American Peptide

в соответствии с описанным ранее протоколом [10]. Для изучения механизмов влияния Аβ42 на развитие окислительного стресса в эндотелиоцитах сосудов головного мозга *in vitro*, клетки предварительно инкубировались с ингибитором НАДФН оксидазы (gp91 ds_tat) в концентрации 1 мкМ или ингибитором свободных радикалов (тирон) в концентрации 5 мМ в течение часа, с последующим добавлением в клеточную культуру Аβ42. Для изучения роли рецептора RAGE на выработку активных форм кислорода, клетки предварительно инкубировались с антителами к RAGE (Abcam) в концентрации 5 мкг/мл на протяжении 2 часов или азелнидипином в концентрации 20 нМ на протяжении 4 часов.

Имунофлуоресцентное окрашивание рецептора RAGE

Клетки выращивались на слайдах для микроскопирования до достижения конfluence. После воздействия Аβ (2 и 5 мкМ в течение 1 часа), клетки фиксировались 30 минут в 3.7% растворе формальдегида и обрабатывались 5% BSA в течении 1 часа. Для блокирования неспецифического связывания, к фиксированным клеткам добавляли 5% овечью сыворотку. Для маркировки мембранного рецептора RAGE клетки метились первичными RAGE-специфичными антителами (АВ_{RAGE}) и вторичными флуоресцентными антителами без пермеабилзации. Для подтверждения специфичности первичных антител, клетки метились только вторичными антителами.

Оценка продукции АФК

Для количественной оценки продукции АФК, клетки окрашивались гидрохлоридом дигидроэтидина (DHE) (Invitrogen), который, при взаимодействии с кислородными радикалами, продуцирует оксиэтидиум (оxу-Е) с более высоким квантовым выходом [11].

Количественная иммунофлуоресцентная микроскопия (КИМ)

Флуоресцентное микроскопирование проводилось с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX 83, оснащенного охлаждаемой CCD камерой и программой MetaMorph при увеличении 40X, объектив NA 0.95. Типичное время экспозиции составляло 400 мсек. На всех фотографиях перед началом анализа устранялись фоновые помехи. Флуоресценция RAGE анализировалась, основываясь на данных интенсивности флуорес-

ценции вторичных антител, затем полученные данные нормализовались по отношению к контролю (контроль принимался за единицу). Количественный анализ проводился путем измерения уровня флуоресценции в изолированных клетках. Подобным же методом анализировалась флуоресценция оxу-Е.

Метод оценки колокализации белков с помощью конфокальной микроскопии

Активность ферментного комплекса НАДФН оксидазы оценивали по сборке субъединиц gp91phox и p47phox путем количественного анализа колокализации меченых белков методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии. Для этого с помощью конфокального микроскопа Olympus FV1000 получали флуоресцентные изображения gp91phox в зеленом спектре (экстинкция 480 нм, эмиссия 535 нм) и p47phox в красном спектре (экстинкция 591 нм, эмиссия 618 нм), используя объектив с 60 кратным увеличением. На сериях флуоресцентных оптических срезов толщиной 1 мкм, в каждой клетке индивидуально, определяли пространственную колокализацию исследуемых объектов посредством наложения локально перекрывающейся флуоресценции двух маркеров: gp91phox и p47phox. Таким образом, на участках колокализации двух флуорофоров в зеленом и красном спектре получали желтый цвет. В процессе анализа из полученных изображений исключали все цвета кроме желтого, для этого использовали программное обеспечение ImageJ и Matlab. Колокализацию субъединиц рассчитывали исходя из отношения перекрывающейся флуоресценции (желтый канал) к общей флуоресценции исходных каналов (зеленый и красный).

Статистический анализ

Полученные данные представлены в виде средней ± стандартная погрешность средней величины (Mean±SEM). Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью t-критерия Стьюдента. Значения считались достоверно различными при $p < 0.05$. Анализ данных проводился с использованием статистической программы SigmaPlot. Каждый эксперимент проводился как минимум в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Взаимодействие Аβ42 с RAGE

Ранее было показано, что присоединение растворимой формы Аβ к растворимому RAGE

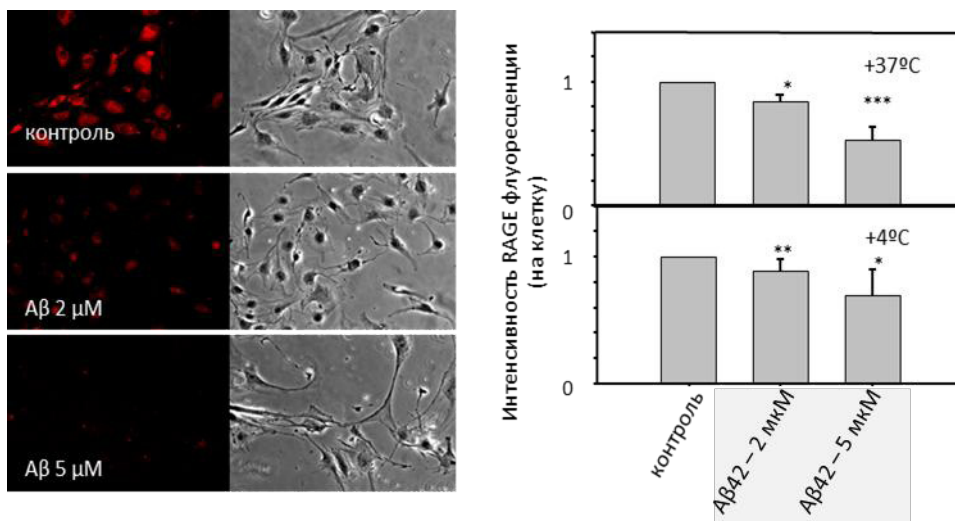


Рисунок 1 – Бета амилоид уменьшает интенсивность флуоресценции клеток, меченых антителами к RAGE. * - $p \leq 0.05$, ** - $p \leq 0.01$, *** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем

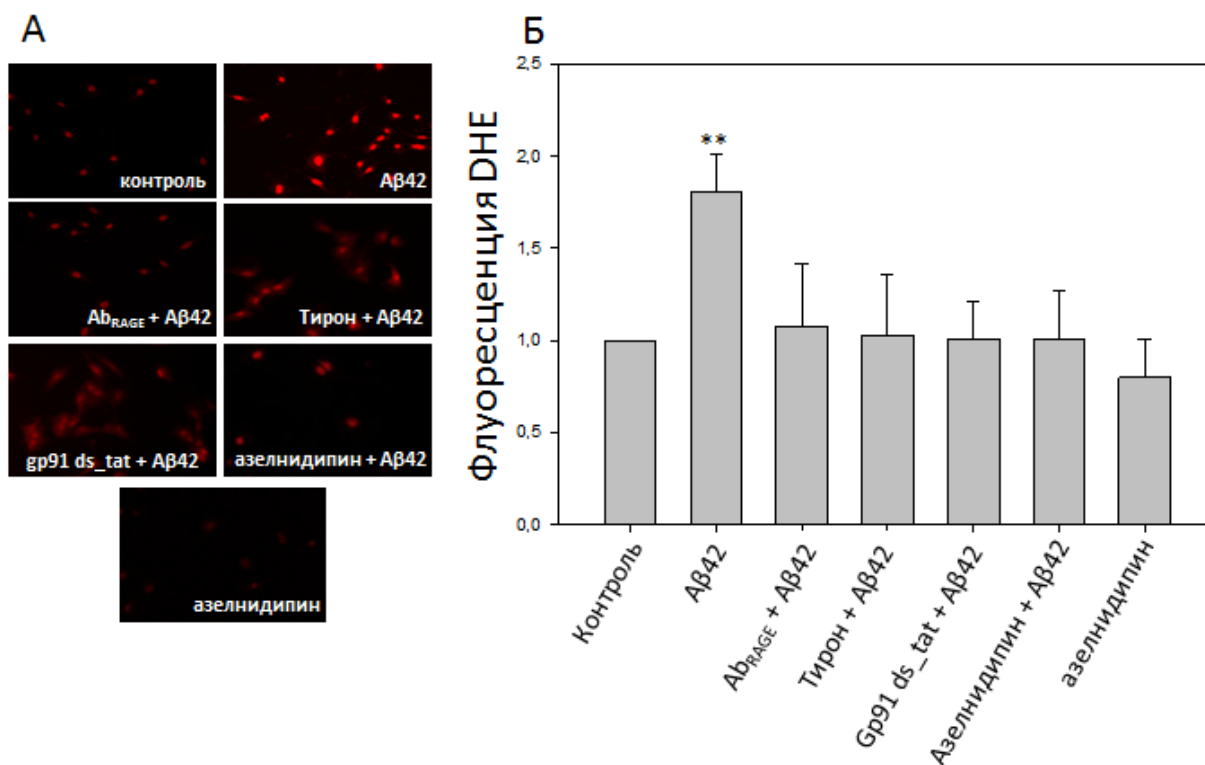


Рисунок 2 – Эффект антител к RAGE и ингибитора НАДФН оксидазы (gp91 ds_tat) на индуцированное бета амилоидом образование АФК в эндотелиальных клетках церебральных капилляров: микрофотографии клеток, обработанных DHE (A); количественная оценка интенсивности DHE флуоресценции (B) ** - $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем

ингибирует дальнейшую агрегацию Аβ пептида, в то время как мембранное взаимодействие RAGE-Аβ активирует фактор транскрипции NF-κB, способствуя хроническому нейровоспалению [12]. Для дальнейшего доказательства взаимодействия Аβ с рецептором RAGE, клетки инкубировали с 2 and 5 мкМ Аβ42 при температуре 37°C и 4°C (в условиях супрессии интернализации поверхностных рецепторов), после чего метили RAGE-специфичными антителами (АВ_{RAGE}) и проводили количественный иммунофлуоресцентный анализ АВ_{RAGE} на поверхности клеток (рисунок 1). Результаты исследований показали, что Аβ42 уменьшает интенсивность флуоресценции клеток, меченных АВ_{RAGE}, как при 37°C, так и при 4°C, позволяя сделать предположение о том, что Аβ42 и АВ_{RAGE} конкурентно связываются с RAGE на поверхности ЭКЦК.

Изучение влияния Аβ42 – RAGE взаимодействия на генерацию активных форм кислорода

На рисунке 2А представлены микрофотографии обработанных ДНЕ эндотелиальных клеток, подвергшихся 2-х часовому воздействию Аβ42, антиоксидантом тироном, ингибитором НАДФН оксидазы (gp91ds-tat), АВ_{RAGE} и азелнидипином, а также оценка интенсивности ДНЕ флуоресценции, являющейся количественной характеристикой выработки АФК в клетках (рисунок 2Б).

Согласно полученным данными, инкубация клеток с 5 мкМ бета-амилоида приводит к почти 100%-му увеличению выработки АФК. Тем не менее, предварительная обработка клеток ингибитором НАДФН оксидазы, также как и блокирование рецептора RAGE специфичными к нему антителами или добавление в культуру клеток азелнидипина (ингибитора RAGE) полностью предотвращало накопление АФК в клетках. В то же самое время, сами по себе антитела не вызывали изменения интенсивности ДНЕ флуоресценции. В качестве позитивного контроля было показано, что антиоксидант тирон также предотвращал выработку кислородных радикалов.

Несмотря на многочисленные данные, подтверждающие тот факт, что окислительный стресс является основным фактором, приводящим к дисфункции клеток гемато-энцефалического барьера при АД, механизмы Аβ-индуцированной генерации АФК до конца не выяснены [13,14]. Известно, что НАДФН ок-

сидаза является основным источником АФК в эндотелиальных клетках церебральных капилляров и может активироваться бета-амилоидом [15]. Представленные в данном разделе результаты свидетельствуют о том, что блокирование рецептора RAGE и ингибирование активности НАДФН оксидазы в нейроваскулярных эндотелиоцитах снижают уровень генерации супероксид аниона, однако не проясняют до конца вопроса о наличии связи между RAGE, активацией НАДФН оксидазы и генерацией АФК. В связи с этим, следующим шагом настоящего исследования явилось изучение механизма сигнальной трансдукции от рецептора RAGE к АФК у нейроваскулярных эндотелиоцитов.

Изучения влияния RAGE-специфичных антител на активацию НАДФН оксидазы в эндотелиоцитах при воздействии Аβ42

НАДФН оксидаза является мембранным ферментом, катализирующим выработку АФК из кислорода и НАДФ. Это комплексная система, состоящая из двух мембранных (gp91-phox и p22-phox) и трех цитозольных (p67-phox, p47-phox и p40-phox) субъединиц, а также G протеина [16]. Активация НАДФН оксидазы связана с миграцией цитозольных компонентов к поверхности клетки и присоединением к цтоплазматическим субъединицам. Для изучения роли Аβ-RAGE взаимодействия на активацию НАДФН оксидазы был проведен количественный анализ действия Аβ42 и АВ_{RAGE} на колокализацию субъединиц gp91-phox и p47-phox, меченных флуоресцентными красителями с разными спектрами возбуждения и эмиссии (рисунок 3).

Видно что в клетках, которые подвергали воздействию Аβ42, коэффициент колокализации субъединиц gp91phox и p47phox резко возрастал по сравнению с контролем, что может служить индикатором активации ферментного комплекса. В то же самое время, блокирование рецептора RAGE значительно снижало уровень активации НАДФН оксидазы, индуцированной Аβ42. Об этом можно было судить по снижению коэффициента колокализации субъединиц gp91phox и p47phox в клетках данных групп. Как позитивный контроль, gp91ds_tat также блокировал колокализацию gp91phox и p47phox. Сами по себе АВ_{RAGE} и ингибитор gp91ds_tat не влияли на активацию НАДФН оксидазы, уровень колокализации субъединиц фермента оставался на уровне контрольных значений.

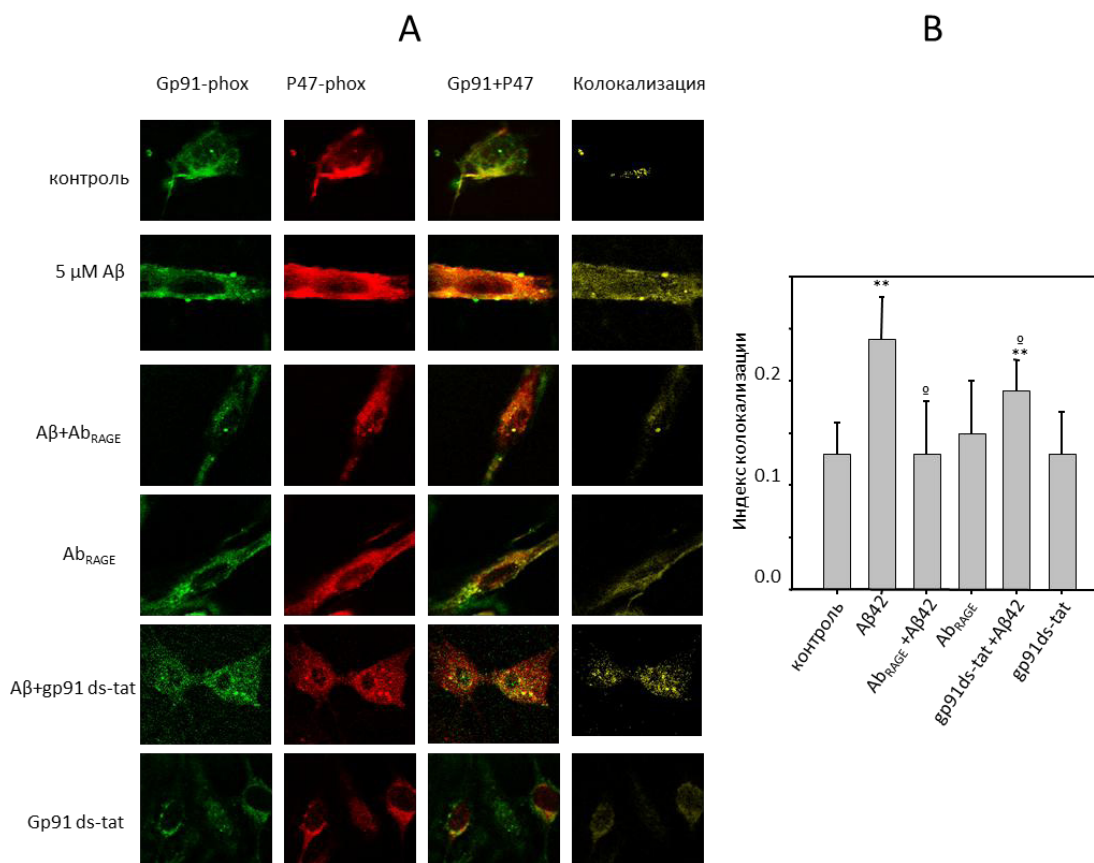


Рисунок 3 – Изображение снимков полученных в результате колокализации субъединиц НАДФН оксидазы (gp91phox и p47phox) в нейроваскулярных эндотелиоцитах (А) и количественная оценка колокализации данных субъединиц. ** - $P \leq 0,01$ по сравнению с контролем; ° - $P \leq 0,05$ по сравнению с клетками которые инкубировали только с Aβ42

Суммируя вышесказанное, можно констатировать, что Aβ42 индуцирует генерацию АФК в эндотелиоцитах через активацию рецептора RAGE который, в свою очередь, контролирует сборку и активацию НАДФН оксидазы. Ранее уже была продемонстрирована возможная связь между RAGE и окислительным стрессом [4-7]. Генерация АФК была показана при (AGE)-RAGE взаимодействии (AGE – конечные продукты гликирования) в эндотелиальных клетках человека [17]. Кроме того,

существуют данные о том, что антитела к RAGE способны супрессировать инициированный бета-амилоидом окислительный стресс в эндотелиальных и нейральных клетках [4]. Полученные нами результаты позволяют сделать заключение о том, что блокирование RAGE рецептора препятствует сборке НАДФН оксидазы и генерации АФК, нивелируя таким образом цитотоксическое действие Aβ42, и существует необходимость исследовать новые перспективные блокаторы оси RAGE/Aβ.

Литература

1 Association A.s. *Alzheimer's and Dementia: 2012 Alzheimer's disease facts and figures* // *The Journal of the Alzheimer's Association* -March 2012. -Vol. 8. – P. 131-168.
 2 Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia // *Acta Neuropathol.* . -2010 -Vol. 120, № 3. – P. 287-96.
 3 Liu R., Zhang T.-t., Wu C.-x., Lan X., Du G.-h. Targeting the neurovascular unit: Development of a new model and consideration for novel strategy for Alzheimer's disease // *Brain Research Bulletin.* -2011. -Vol. 86, № 1вЂ“2. – P. 13-21.

4 Yan S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P., Stern D., Schmidt A.M. RAGE and amyloid-[beta] peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease // *Nature*. -1996. -Vol. 382, № 6593. – P. 685-691.

5 Arancio O., Zhang H.P., Chen X., Lin C., Trinchese F., Puzzo D., Liu S., Hegde A., Yan S.F., Stern A., Luddy J.S., Lue L.-F., Walker D.G., Roher A., Buttini M., Mucke L., Li W., Schmidt A.M., Kindy M., Hyslop P.A., Stern D.M., Du Yan S.S. RAGE potentiates A[beta]-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice // *EMBO J*. -2004. -Vol. 23, № 20. – P. 4096-4105.

6 Sasaki N., Toki S., Chowei H., Saito T., Nakano N., Hayashi Y., Takeuchi M., Makita Z. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease // *Brain Research*. -2001. -Vol. 888, № 2. – P. 256-262.

7 Lue L.-F., Walker D.G., Brachova L., Beach T.G., Rogers J., Schmidt A.M., Stern D.M., Yan S.D. Involvement of Microglial Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) in Alzheimer's Disease: Identification of a Cellular Activation Mechanism // *Experimental Neurology*. -2001. -Vol. 171, № 1. – P. 29-45.

8 Giri R., Shen Y., Stins M., Du Yan S., Schmidt A.M., Stern D., Kim K.S., Zlokovic B., Kalra V.K. Beta-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1 // *Am J Physiol Cell Physiol*. -2000. -Vol. 279, № 6. – P. C1772-81.

9 Takuma K., Fang F., Zhang W., Yan S., Fukuzaki E., Du H., Sosunov A., McKhann G., Funatsu Y., Nakamichi N., Nagai T., Mizoguchi H., Ibi D., Hori O., Ogawa S., Stern D.M., Yamada K., Yan S.S. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-OI and neuronal dysfunction // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. -2009. -Vol. 106, № 47. – P. 20021-20026.

10 Dahlgren K.N., Manelli A.M., Stine W.B., Jr., Baker L.K., Krafft G.A., LaDu M.J. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability // *J Biol Chem*. -2002. -Vol. 277, № 35. – P. 32046-53.

11 Peshavariya H.M., Dusting G.J., Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase // *Free Radical Research*. -2007. -Vol. 41, № 6. – P. 699-712.

12 Chaney M.O., Stine W.B., Kokjohn T.A., Kuo Y.-M., Esh C., Rahman A., Luehrs D.C., Schmidt A.M., Stern D., Yan S.D., Roher A.E. RAGE and amyloid beta interactions: Atomic force microscopy and molecular modeling // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. -2005. -Vol. 1741, № 1-2. – P. 199-205.

13 Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -1991. -Vol. 88, № 23. – P. 10540-3.

14 Heneka M.T., O'Banion M.K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease // *J Neuroimmunol*. -2007. -Vol. 184, № 1-2. – P. 69-91.

15 Park L., Anrather J., Zhou P., Frys K., Pitstick R., Younkin S., Carlson G.A., Iadecola C. NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Mediate the Cerebrovascular Dysfunction Induced by the Amyloid -beta- Peptide // *J. Neurosci*. -2005. -Vol. 25, № 7. – P. 1769-1777.

16 Babior B.M. NADPH Oxidase: An Update // *Blood*. -1999. -Vol. 93, № 5. – P. 1464-1476.

17 Wautier M.-P., Chappey O., Corda S., Stern D.M., Schmidt A.M., Wautier J.-L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. -2001. -Vol. 280, № 5. – P. E685-694.

Reference

1 Association A.s. *Alzheimer's and Dementia: 2012 Alzheimer's disease facts and figures* // *The Journal of the Alzheimer's Association* -March 2012. -Vol. 8. – P. 131-168.

2 Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia // *Acta Neuropathol.* . -2010 -Vol. 120, № 3. – P. 287-96.

3 Liu R., Zhang T.-t., Wu C.-x., Lan X., Du G.-h. Targeting the neurovascular unit: Development of a new model and consideration for novel strategy for Alzheimer's disease // *Brain Research Bulletin*. -2011. -Vol. 86, № 1B“2. – P. 13-21.

4 Yan S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P., Stern D., Schmidt A.M. RAGE and amyloid-[beta] peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease // *Nature*. -1996. -Vol. 382, № 6593. – P. 685-691.

5 Arancio O., Zhang H.P., Chen X., Lin C., Trinchese F., Puzzo D., Liu S., Hegde A., Yan S.F., Stern A., Luddy J.S., Lue L.-F., Walker D.G., Roher A., Buttini M., Mucke L., Li W., Schmidt A.M., Kindy M., Hyslop P.A., Stern D.M., Du Yan S.S. RAGE potentiates A[beta]-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice // *EMBO J*. -2004. -Vol. 23, № 20. – P. 4096-4105.

6 Sasaki N., Toki S., Chowei H., Saito T., Nakano N., Hayashi Y., Takeuchi M., Makita Z. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease // *Brain Research*. -2001. -Vol. 888, № 2. – P. 256-262.

7 Lue L.-F., Walker D.G., Brachova L., Beach T.G., Rogers J., Schmidt A.M., Stern D.M., Yan S.D. Involvement of Microglial Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) in Alzheimer's Disease: Identification of a Cellular Activation Mechanism // *Experimental Neurology*. -2001. -Vol. 171, № 1. – P. 29-45.

8 Giri R., Shen Y., Stins M., Du Yan S., Schmidt A.M., Stern D., Kim K.S., Zlokovic B., Kalra V.K. Beta-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1 // *Am J Physiol Cell Physiol*. -2000. -Vol. 279, № 6. – P. C1772-81.

9 Takuma K., Fang F., Zhang W., Yan S., Fukuzaki E., Du H., Sosunov A., McKhann G., Funatsu Y., Nakamichi N., Nagai T., Mizoguchi H., Ibi D., Hori O., Ogawa S., Stern D.M., Yamada K., Yan S.S. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-OI and neuronal dysfunction // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. -2009. -Vol. 106, № 47. – P. 20021-20026.

10 Dahlgren K.N., Manelli A.M., Stine W.B., Jr., Baker L.K., Krafft G.A., LaDu M.J. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability // *J Biol Chem*. -2002. -Vol. 277, № 35. – P. 32046-53.

11 Peshavariya H.M., Dusing G.J., Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase // *Free Radical Research*. -2007. -Vol. 41, № 6. – P. 699-712.

12 Chaney M.O., Stine W.B., Kokjohn T.A., Kuo Y.-M., Esh C., Rahman A., Luehrs D.C., Schmidt A.M., Stern D., Yan S.D., Roher A.E. RAGE and amyloid beta interactions: Atomic force microscopy and molecular modeling // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. -2005. -Vol. 1741, № 1-2. – P. 199-205.

13 Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -1991. -Vol. 88, № 23. – P. 10540-3.

14 Heneka M.T., O'Banion M.K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease // *J Neuroimmunol*. -2007. -Vol. 184, № 1-2. – P. 69-91.

15 Park L., Anrather J., Zhou P., Frys K., Pitstick R., Younkin S., Carlson G.A., Iadecola C. NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Mediate the Cerebrovascular Dysfunction Induced by the Amyloid -beta- Peptide // *J. Neurosci*. -2005. -Vol. 25, № 7. – P. 1769-1777.

16 Babior B.M. NADPH Oxidase: An Update // *Blood*. -1999. -Vol. 93, № 5. – P. 1464-1476.

17 Wautier M.-P., Chappey O., Corda S., Stern D.M., Schmidt A.M., Wautier J.-L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. -2001. -Vol. 280, № 5. – P. E685-694.