

ISSN 1027-8133

Том 40, Номер 1

Январь - Февраль - Март
2023



НЕЙРОХИМИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 1, 2023

Обзоры

Перспективы использования малых экстраклеточных везикул в качестве транспортного средства через гематоэнцефалический барьер

Л. Г. Хаспеков, А. А. Яковлев

3

Биохимические тромбоцитарные маркеры развития когнитивных нарушений при болезни Альцгеймера

*А. Н. Кординцев, Н. В. Изможсера, А. А. Попов,
Л. И. Волкова, И. П. Антропова, А. В. Рябина*

13

Роль интерлейкина-6 в механизмах развития шизофрении

Г. В. Рукавишников, Т. В. Жилева, Е. Е. Дубинина, Г. Э. Мазо

23

Нейроспецифические белки как трансдиагностические маркеры аффективных расстройств

Л. А. Левчук, Н. А. Бохан, С. А. Иванова

30

Теоретические работы

О сходстве механизмов обработки обонятельной, слуховой и зрительной информации в ЦНС (гипотеза)

И. Г. Силькис

35

Экспериментальные работы

Эффект модуляторов системы биосинтеза кофермента А на проявления метаболического стресса и систему глутатиона в ЦНС при алюминиевом нейротоксикозе

*Д. С. Семенович, В. А. Гуринович, Е. П. Лукиенко, И. Н. Катковская,
О. В. Титко, Н. П. Канунникова, А. Г. Мойсёнок*

48

Исследование участия рецепторов мозга в механизме противосудорожного действия нового производного оксима 4-бензоилпиридина ГИЖ-298

С. А. Литвинова, Е. А. Кондрахин, Т. А. Воронина, Е. В. Васильева, Г. И. Ковалев

59

Роль моноаминов мозга в формировании аудиогенных миоклонических судорог у крыс линии Крушинского—Молодкиной

*С. А. Литвинова, Т. А. Воронина, В. С. Кудрин, В. Б. Наркевич,
Н. М. Сурина, И. И. Полетаева, И. Б. Федотова*

68

Аллопарентная забота и постнатальное развитие гетерозиготных TRH2 трансгенных мышей

А. А. Кибиткина, Е. Р. Василевская, Г. С. Толмачева, А. М. Зубалий

75

Методы

Разработка количественного иммуноферментного анализа нейротрофического фактора мозга на основе рекомбинантного антигена

О. В. Павлова, А. А. Мурашко, Н. В. Андрющенко, О. И. Гурина, К. А. Павлов

86

Клиническая нейрохимия

Содержание провоспалительных хемокинов в крови у пациентов с первым эпизодом шизофрении до назначения терапии

А. В. Сахаров, С. Е. Голыгина, А. С. Прохоров, П. П. Терешков

92

Contents

Vol. 40, no. 1, 2023

Review Articles

- Outlooks of Using Small Extracellular Vesicles as a Transport Vehicle through the Blood–Brain Barrier
L. G. Khaspekov and A. A. Yakovlev 3
- Biochemical Platelet Markers of Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease
A. N. Kodintsev, N. V. Izmozherova, A. A. Popov, L. I. Volkova, I. P. Antropova, and A. V. Ryabinina 13
- Interleukin-6 Role in Schizophrenia Pathological Mechanisms
G. V. Rukavishnikov, T. V. Zhilyaeva, E. E. Dubinina, and G. E. Mazo 23
- Neurospecific Proteins as Transdiagnostic Markers of Affective Disorders
L. A. Levchuk, N. A. Bokhan, and S. A. Ivanova 30
-

Theoretical Articles

- On the Similarity of the Mechanisms of Processing Olfactory, Auditory and Visual Information in the CNS (A Hypothesis)
I. G. Silkis 35
-

Experimental Articles

- Enzyme a Biosynthesis System on Manifestation of Metabolic Stress and Glutathione System in the CNS under Aluminium Neurotoxicosis
D. S. Semenovich, V. A. Gurinovich, E. P. Lukiyeiko, I. N. Katkovskaya, O. V. Titko, N. P. Kanunnikova, and A. G. Moiseenko 48
- Participation of Brain Receptors in the Mechanism of Anticonvulsant Action of a New 4-Benzoylpyridine Oxime Derivative GIZH-298
S. A. Litvinova, E. V. Kondrakhin, T. A. Voronina, E. V. Vasilyeva, and G. I. Kovalev 59
- Role of Brain Monoamines in the Formation of Audiogenic Myoclonic Seizures in Krushinsky–Molodkina Rats
S. A. Litvinova, T. A. Voronina, V. S. Kudrin, V. B. Narkevich, N. M. Surina, I. I. Poletaeva, and I. B. Fedotova 68
- Alloparental Care and Postnatal Development of Heterozygous TPH2 Transgenic Mice
A. A. Kibitkina, E. R. Vasilevskaya, G. S. Tolmacheva, and A. M. Zubalii 75
-

Methods

- Development of Quantitative Enzyme Immunoassay of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Basis of Recombinant Antigen
O. V. Pavlova, A. A. Murashko, N. V. Andriushchenko, O. I. Gurina, and K. A. Pavlov 86
-

Clinical Neurochemistry

- Blood Content of Pro-Inflammatory Chemokines in Patients with First Episode of Schizophrenia before Therapy
A. V. Sakharov, S. E. Golygina, A. S. Prokhorov, and P. P. Tereshkov 92
-

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАЛЫХ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В КАЧЕСТВЕ ТРАНСПОРТНОГО СРЕДСТВА ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

© 2023 г. Л. Г. Хаспекhov¹, А. А. Яковлев^{2, 3, *}

¹Научный центр неврологии Министерства науки и высшего образования РФ, Москва, Россия

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.08.2022 г.

После доработки 17.09.2022 г.

Принята к публикации 25.09.2022 г.

Одним из наиболее перспективных объектов исследования в нейробиологии в настоящее время являются малые экстраклеточные везикулы (мЭВ). К этому классу частиц относят мембранные везикулы размером до 200 нм. В состав мЭВ входят белки, липиды, нуклеиновые кислоты, низкомолекулярные метаболиты. В силу особенностей строения мЭВ не поглощаются макрофагами и могут довольно долго, по сравнению с другими наночастицами, циркулировать в крови. Принято считать, что мЭВ секретируются всеми клетками организма и осуществляют пока не выясненный во многих деталях межклеточный сигналинг. Способность этих наночастиц проникать через гематоэнцефалический барьер позволяет рассматривать их в качестве перспективных транспортных средств для переноса лекарственных препаратов в головной мозг.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, малые экстраклеточные везикулы, транцитоз, эндотелиальные клетки сосудов головного мозга

DOI: 10.31857/S1027813323010089, **EDN:** DUIRZW

Список сокращений

БА – болезнь Альцгеймера

БП – болезнь Паркинсона

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

РТФ – рецептор трансферрина

мЭВ – малые экстраклеточные везикулы

ЭК – эндотелиальные клетки

AMT – адсорбтивно опосредованный транцитоз

BDNF – нейротрофический фактор мозга

BMECs – эндотелиальные клетки микрососудов головного мозга

LDL-R – рецептор липопротеинов низкой плотности

RMT – рецепторно опосредованный транцитоз

siRNA – короткие интерферирующие РНК

Заболевания головного мозга представляют собой большую медицинскую и социальную проблему. Сложность их лечения обусловлена высокой чувствительностью мозга к повреждению и невозможностью полного восстановления нервных клеток, гибель которых начинается уже через несколько минут после кислородно-глюкозного голодания. Данные обстоятельства определяют и социальную

проблему – высокую смертность и инвалидизацию как последствия повреждения головного мозга.

К настоящему времени дальше понимания лишь некоторых механизмов церебральной патологии изучение повреждений головного мозга не продвинулось. Одним из препятствий для их эффективного лечения является то, что большинство лекарств не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), который затрудняет их эффективную доставку к клеткам головного мозга не только в условиях патологии, но и в норме.

Под термином “ГЭБ” подразумевается комплекс мелких кровеносных капилляров, плотная сеть которых осуществляет васкуляризацию мозга, при этом защищая его от повреждающих воздействий, оказываемых токсическими эндогенными и экзогенными факторами, циркулирующими в кровяном русле. На микроскопическом уровне ГЭБ состоит из однородного слоя микрососудистых эндотелиальных клеток (ЭК), соединенных между собой боковыми плотными контактами (tight junctions), которые препятствуют межклеточному переносу и/или пассивной диффузии молекул через ГЭБ, обеспечивая его высокую селективность [1]. На стороне церебральной париепхимы ЭК поддерживаются перицитами – сократитель-

ными клетками, заключенными в тонкий слой внеклеточного матрикса (базальную пластинку), и подкреплены концевыми ножками астроцитарной глии. Клетки эндотелия, перициты и астроциты в сочетании с нейронами, микроглией и олигодендроцитами образуют нейроваскулярную единицу (neurovascular unit), способствующую поддержанию гомеостаза ЦНС [1].

Таким образом, ГЭБ, вследствие специфической регуляции транспорта необходимых головному мозгу метаболитов из кровяного русла в церебральную паренхиму, выполняет функцию защиты ЦНС от разнообразных нейротоксических соединений, обеспечивая таким образом поддержание ее гомеостаза.

Однако у барьерной функции ГЭБ есть и обратная сторона, а именно, его свойства не только препятствуют проникновению в мозг вредных веществ, но и затрудняют транспорт макромолекулярных лекарственных средств, для которого часто необходимо участие специфических рецепторов и транспортных белков, локализованных непосредственно на ГЭБ. В связи со сказанным выше не будет преувеличением подчеркнуть, что в настоящее время одной из основных задач фундаментальной медицины является поиск эндогенных механизмов, способствующих целенаправленной доставке макромолекул в мозг через ГЭБ.

В последние годы появились основания считать, что одним из природных переносчиков лекарств через ГЭБ являются малые экстраклеточные везикулы (мЭВ), основными представителями которых являются экзосомы и микрочастицы. Вначале стоит отметить, что Международное общество по изучению экстраклеточных везикул рекомендует называть мЭВ любые высвобождаемые клетками мембранные структуры (экзосомы, микровезикулы, эктосомы, онкосомы, микрочастицы и т.д.) размером меньше 200 нм, если не показана их точная принадлежность к какому-то классу, например, не проведено окрашивание специфическими антителами, не проведена электронная микроскопия, преципитация за специфический антиген и т.д. [2]. Авторы рекомендаций отмечают, что точная идентификация природы экстраклеточных везикул представляет собой сложную или даже невыполнимую задачу, поэтому в настоящее время для всех невыясненных ситуаций в научной литературе рекомендуется пользоваться термином мЭВ. При этом зачастую в статьях авторы употребляют термины экзосомы и микровезикулы, не приводя доказательств происхождения этих частиц и не задумываясь о том, что неправильное употребление терминов может запутать читателя. Мы используем термин “малые экстраклеточные везикулы (мЭВ)” для обозначения частиц размером меньше 200 нм, как и рекомендовано профессиональным сообществом.

Исследования последних лет говорят, что мЭВ — действительно уникальный объект и их важность для исследования мозга сложно переоценить. Простое перечисление церебральных патологий, при которых показана диагностическая и терапевтическая значимость мЭВ, уже само по себе производит впечатление: болезнь Альцгеймера (БА) и другие формы деменции [3–7], болезнь Паркинсона (БП) [8–10], синдром Дауна [11], боковой амиотрофический склероз [12, 13], рассеянный склероз [14–16], инсульт [17–20], эпилепсия [21]. Кроме того, появляются работы о связи мЭВ со старением [22], депрессией [23–25], биполярным расстройством [26, 27], нейрогенезом [28, 29] и стрессом [30].

Такой внушительный перечень активности мЭВ определяется несколькими простыми особенностями. Во-первых, эти везикулы размером около 100 нм секретируются практически постоянно всеми клетками организма и содержат на мембране опознавательные знаки “свой/не ешь меня” для иммунной системы организма [31, 32]. Во-вторых, они способны проходить через тканевые барьеры, включая ГЭБ [33, 34]. Эти свойства позволяют мЭВ довольно долго циркулировать в крови и проникать в любые органы. Почему мЭВ содержат молекулы, характерные для физиологического состояния или патологии, остается неизвестным. Видимо, в организме существуют механизмы сигналинга с использованием мЭВ, с помощью которого клетки обмениваются информацией о возникающих патологиях [35]. Поскольку особенностью мЭВ, наиболее важной для их потенциального терапевтического применения, является способность проникать через ГЭБ, эта особенность нуждается в более подробном обсуждении.

Являясь естественным физиологическим объектом, мЭВ способны путем транс- и/или парацитоза доставлять в мозг как обычные терапевтические агенты массой порядка одного кДа, так и крупные биомacroмолекулы массой сотни кДа [36–38]. Современные данные свидетельствуют о том, что мЭВ способны проходить через ГЭБ из кровяного русла как в направлении паренхимы мозга, так и обратно. Эти везикулы транспортируют и доставляют в клетки-мишени фармацевтические макромолекулы, мембранные и цитозольные белки, генетический материал (мРНК и некодирующие РНК, в том числе микроРНК), т.е. соединения, которые в свободном состоянии обычно не способны проникать через плазматическую мембрану эндотелиальных клеток (ЭК) ГЭБ [39].

Основным компонентом ГЭБ, регулирующим перенос мЭВ, являются именно ЭК. Контакт мЭВ, циркулирующих в кровяном русле, с ЭК активирует ряд механизмов, таких как фагоцитоз, эндоцитоз, микропиноцитоз, при участии которых происходит поглощение клетками мЭВ и активация их притока в ткань мозга [40]. Транспорт мЭВ через

ГЭБ скорее всего является классическим примером транцитоза. После прикрепления мЭВ к ЭК и слияния с ними содержимое мЭВ высвобождается в цитозоль ЭК, при этом взаимодействие белков мембраны мЭВ с рецепторами на поверхности ЭК приводит к формированию между мЭВ и ЭК соединений типа плотных контактов. Содержимое мЭВ, высвободившееся в ЭК, захватывается эндосомами и перемещается ими к аблюминальной поверхности ЭК [41, 42]. Концентрация мЭВ в крови является важным фактором их транцитоза через ГЭБ, поскольку существенная доля мЭВ внутри ЭК может быть направлена на деградацию в лизосомы [43].

Транспорт различных соединений через ГЭБ опосредуется рядом физиологических механизмов, таких как активный эффлюкс, адсорбционно-опосредованный транцитоз, транспорт, опосредуемый специфическими рецепторами (фолиевой кислоты, трансферрина, инсулина, глутамата, скавенджер-рецепторами и другими) [44]. Контакт с ЭК мЭВ, циркулирующих в кровяном русле, стимулирует эндоцитоз, микропиноцитоз, фагоцитоз и слияние плазматических мембран — механизмы, вовлеченные в поглощение мЭВ и ускоряющие их поступление в ткань головного мозга [40, 45, 46]. Помимо мЭВ, проникающих в мозг из крови, в самом мозге также содержатся мЭВ собственного производства [47–51], где они интенсивно секретируются различными типами глиальных клеток (астроглией, олигодендроглией, микроглией) и нейронами (рис. 1). Эти эндогенные мЭВ, захватываемые как барьерными ЭК, так и дистанционно глиальными клетками и нейронами, осуществляют организованный направленный сигналинг между клетками мозга, поддерживая его гомеостаз [52–59].

Согласно современным представлениям, основными механизмами поступления в ткань мозга через ГЭБ экзогенных мЭВ являются транцитоз — после тесного контакта (слияния) и интернализации с ЭК, и, возможно, парацитоз — транспорт в ткань мозга через ГЭБ в результате проникновения мЭВ в плотные контакты между ЭК [37, 60]. После слияния и интернализации содержимое мЭВ высвобождается в цитозоль ЭК, при этом взаимодействие белков мембраны мЭВ с рецепторами на поверхности ЭК приводит к формированию между мЭВ и ЭК соединений типа плотных контактов. Показано, что мЭВ крови, помеченные флуоресцентными красителями RНК26 и DiD (эти красители неселективно встраиваются в мембрану везикул), при инкубации с ЭК линии bEnd.3, происходящими из микрососудов мозга, проникают в эти ЭК путем транцитоза, а затем мЭВ или высвободившееся из них содержимое захватывается эндосомами и перемещается ими к аблюминальной поверхности ЭК [41, 42, 61]. *In vivo* транцитоз экзосом был показан на рыбках *Danio rerio*,

у которых зрелый ГЭБ развивается в течение 3 дней после оплодотворения [62]. В этих экспериментах визуализация в реальном времени позволила проследить транспорт экзогенных мЭВ вплоть до их слияния с цитоплазматической мембраной ЭК.

Известны различные пути транспортировки через ГЭБ, используемые мЭВ для перемещения через барьер лекарственных препаратов, не преодолевающих его путем простой диффузии. Наиболее распространенными из них являются рецепторно-опосредованный транцитоз (receptor-mediated transcytosis, **RMT**) и адсорбтивно-опосредованный транцитоз (adsorptive-mediated transcytosis, **AMT**), из которых **RMT** позволяет наиболее эффективно транспортировать из кровяного русла через ЭК ГЭБ в ткань мозга низкомолекулярные терапевтические средства, наноразмерные частицы и т.п. в составе мЭВ. При **RMT** (рис. 2) участвующие в нем рецепторы активно экспрессируются на мембране ЭК микрососудов головного мозга (brain microvascular endothelial cells, **BMECs**), причем на наружной мембране ЭК происходит специфическое связывание транспортируемого соединения с рецептором, что инициирует эндоцитоз, с последующим переносом формирующихся эндосом, содержащих компартментализованные соединения, через ЭК в мозг [63–65]. Рецепторы, используемые мЭВ для связывания с ЭК, хорошо изучены, также давно известна способность этих рецепторов опосредовать транспорт веществ и частиц из крови в мозг через ГЭБ.

Рецептор трансферрина (РТФ), гликопротеина, обеспечивающего транспорт железа в клетки головного мозга, опосредует транцитоз в ЭК капилляров мозга мышей и человека [66, 67]. Выявлена опосредуемая РТФ доставка в мозг через ГЭБ липосом [29] и наносфер хитозана — природного полисахарида с высокой липотропной активностью [68]. Кроме того, показаны позитивные результаты направленной внутримозговой доставки конъюгированного с античеловеческим антителом к РТФ лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы, дефицит которого имеет место при наследственном заболевании — мукополисахаридозе II (синдроме Хантера) [69].

Рецептор липопротеинов низкой плотности (low density lipoprotein receptor, LDL-R) опосредует транцитоз липопротеинов, обогащенных холестерином, и представляет собой мембранный белок, специфически распознающий аполипопротеины В (АРОВ) и Е (АРОЕ). Активная экспрессия LDL-R в головном мозге позволяет ему осуществлять функцию эффективного переносчика. Пептиды, полученные из АРОВ и АРОЕ, при конъюгировании с белками, например, ферментами лизосом, облегчают транспортировку белков через ГЭБ [70]. Взаимосвязь липосом и полимером с пепти-

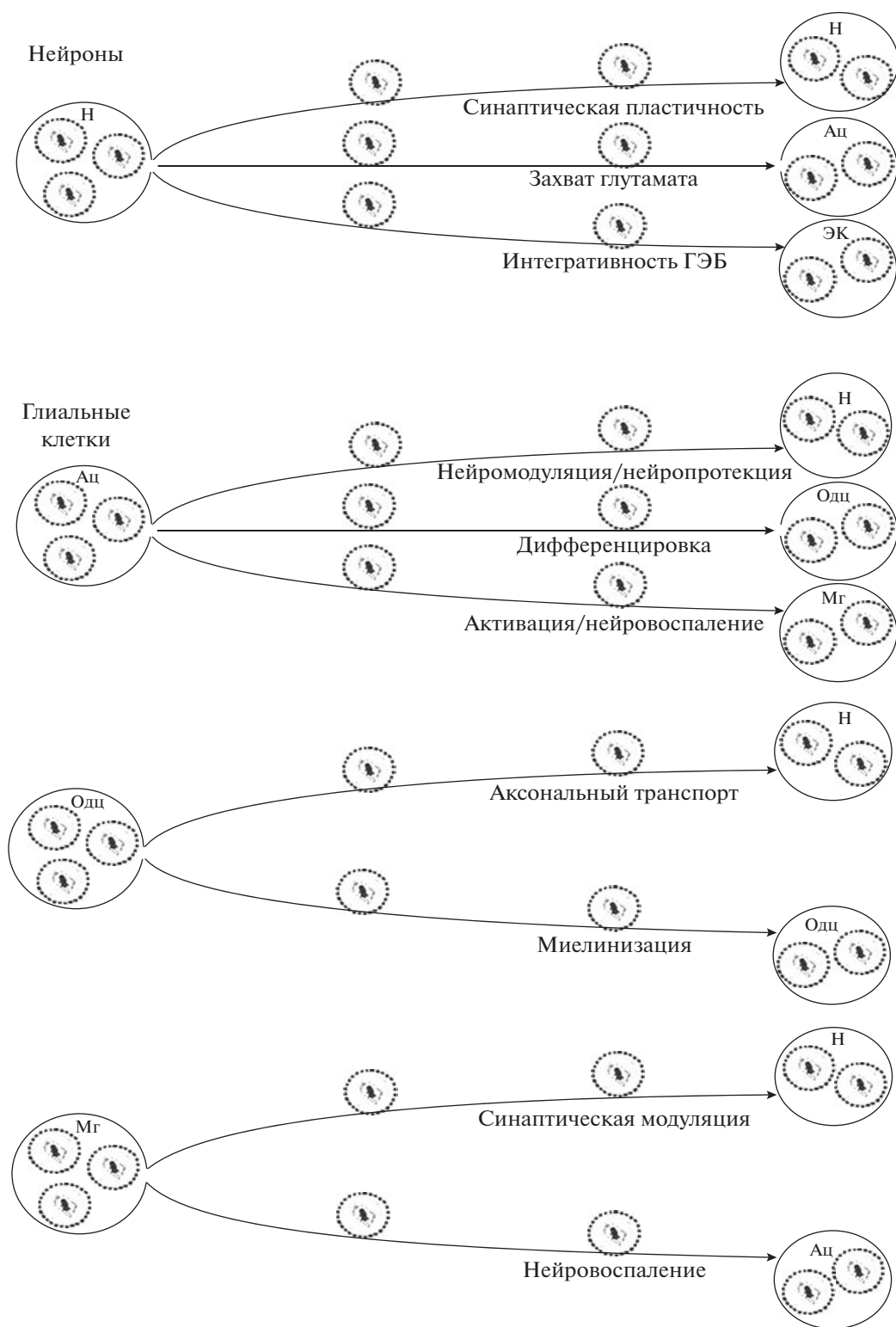


Рис. 1. Малые экстраклеточные везикулы нейронов и глиальных клеток доставляют через ГЭБ свою нагрузку к клеткам ЦНС, регулируя ее гомеостаз и адаптационные процессы. Н – нейроны; Ац – астроциты; Одц – олигодендроциты; Мг – микроглия; ЭК – эндотелиальные клетки.

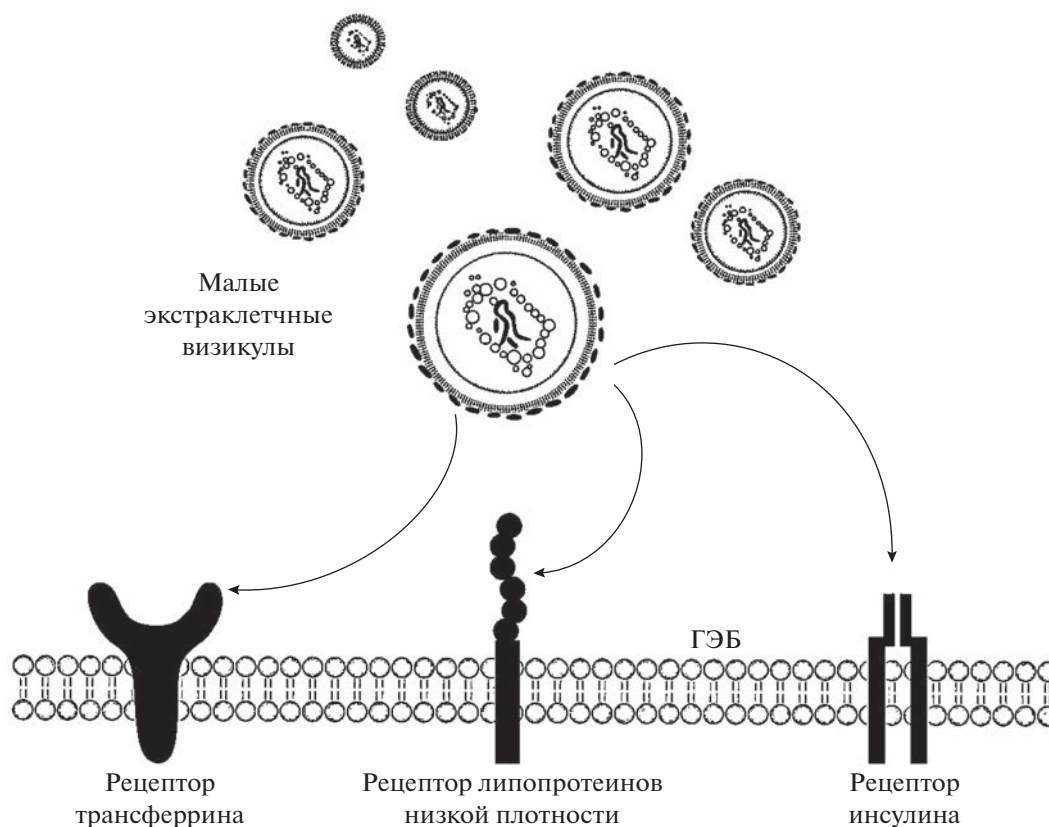


Рис. 2. Взаимодействие малых экстраклеточных везикул, циркулирующих в кровяном русле, с рецепторами эндотелиальных клеток головного мозга при рецептор-опосредуемом транцитозе.

дами из АРОЕ ускоряет их опосредуемый LDL-R перенос через ГЭБ в ткань мозга путем транцитоза в ВМЕС, что также характерно и для пептидов, выделенных из АРОВ [71, 72].

Рецептор инсулина и другие рецепторы. Рецептор инсулина (INS-R), опосредующий транцитоз, экспрессируется в микрососудах головного мозга человека активнее, чем в других тканях [73]. У пациентов с мукополисахаридозом I типа показано ускорение транцитозной доставки в мозг высокомолекулярных лекарственных средств (например, L-идуронидазы) при использовании гуманизированных антител, конъюгированных с INS-R (humanization of anti-human insulin receptor antibody, HIRMAb) [74–76], внутривенное введение которых приводило к положительным соматическим и когнитивным эффектам. Тяжелая цепь антигена поверхности клетки, обозначаемого как 4F2 (4F2 cell-surface antigen heavy chain, псевдоним — CD98hc) — гетеродимерный белок, который активно экспрессируется на мембранах ВМЕС человека и мыши, связывая аминокислоты и транспортируя их через ГЭБ [66, 67, 77]. Транспорт глюкозы GLUT1 — однонаправленный белковый переносчик глюкозы, кодируемый у человека геном *SLC2A1* — обеспечивает облегченный транс-

порт глюкозы через плазматическую мембрану, в том числе, клеток ВМЕС, на мембране которых он активно экспрессируется, и способствует переносу в ткань мозга через ГЭБ наночастиц типа липосом и мицелл [78, 79].

В эксперименте не всегда можно обнаружить, какими рецепторами опосредуется проникновение мЭВ через ГЭБ. Тем не менее, оно происходит, скорее всего, путем транцитоза, что было показано неоднократно. В модели ишемического инсульта у мышей экстраклеточные везикулы, в том числе мЭВ, из нейрональных стволовых клеток по сравнению с везикулами из мезенхимальных стволовых клеток, более эффективно достигали паренхимы мозга через ГЭБ [80]. У рыбок *Danio rerio* нагруженные цитостатическим антибиотиком доксорубицином мЭВ из ВМЕС или клеток опухоли мозга доставляли содержимое к клеткам опухоли [81]. В этой работе в эмбрионы рыбки через кардинальную вену вводили мЭВ, нагруженные флуоресцентным красителем родамином-123, а затем его флуоресценцию регистрировали в кровяном русле. Одновременно было показано, что родамин-123 сам по себе, вне мЭВ, в паренхиму мозга не проникал. С другой стороны, меченые родамином-123 мЭВ из ЭК линии

bEND.3 активно проникали в структуры мозга, подтверждая способность этих носителей доставлять лекарственные средства в терапевтических целях через ГЭБ.

Из внеклеточного пространства мЭВ интернализуются клетками-реципиентами путем различных механизмов: эндоцитоза, микропитоза, фагоцитоза, захвата плазматической мембраной. Результаты ряда работ допускают, что основным механизмом транспорта мЭВ внутрь ЭК может быть эндоцитоз [82]. Следует отметить, что эндоцитоз облегчается патологическими состояниями, что было показано в отношении мЭВ из макрофагов на моделях *in vivo* и *in vitro*. В модели ишемического инсульта *in vitro* мЭВ, нагруженные люциферазой, значительно интенсивнее, чем в норме, пересекали монослой ВМЕС [83]. Проникновение мЭВ в клетки происходило путем эндоцитоза, хотя сравнительно небольшое количество везикул все же преодолевали монослой ВМЕС параклеточным путем, в результате пассивной диффузии через межклеточные контакты между этими клетками. В модели воспаления у мышей внутривенно введенные мЭВ из наивных макрофагов (naïve macrophage) преодолевали ГЭБ путем транцитоза, и в условиях воспаления делали это более эффективно, чем в норме, доставляя в мозг BDNF [84]. Таким образом, макрофагальные мЭВ являются возможными перспективными переносчиками через ГЭБ в мозг лекарственных соединений в условиях церебральной патологии. При этом процесс эндоцитозной интернализации мЭВ в ЭК зависит от типа клеток, которые секретируют мЭВ. Как считается, мЭВ, будучи секретированы различными клетками, несут различную нагрузку, в том числе белки и липиды. Кроме того, мЭВ из разных клеток используют разные способы проникновения через ГЭБ, а эффективность этого проникновения, в свою очередь, может зависеть от характера патологического состояния мозга [85].

Помимо эндоцитоза, проницаемость ГЭБ для мЭВ опосредуется, как полагают, еще одним механизмом. Так, показано, что мЭВ из клеток рака молочной железы содержат микроРНК miR-105, снижающую целостность ГЭБ за счет непосредственного воздействия на белок ZO-1, основной молекулярный компонент плотных контактов между ВМЕС [86]. Похожий эффект оказывали мЭВ из нормальных стволовых клеток пульпы зуба, повышая проницаемость микрокапилляров на начальной стадии острого воспаления [87]. Кроме того, проницаемость ГЭБ значительно возрастает при цереброваскулярных заболеваниях, что позволяет проходить через него макромолекулярным соединениям белковой природы [88]. В культуре клеток головного мозга грызунов и на интактных зародышах рыбки *Danio rerio* показана возможность поддержания целостности ГЭБ нейрональными мЭВ, содержащими микроРНК miR-132,

путем интернализации этих мЭВ в ВМЕС и переноса таким образом miR-132 в ВМЕС [89]. После этого miR-132 воздействует непосредственно на кальций/кальмодулин-зависимую киназу эукариотического фактора элонгации 2 (eukaryotic elongation factor 2 kinase, eef2k), регулируя экспрессию васкулярного эндотелиального кадгерина, важного фактора, укрепляющего плотные контакты. Таким образом, мЭВ, несущие miR-132, могут поддерживать целостность церебральных сосудов, в отдельных случаях способствуя терапии неврологических заболеваний.

В терапии БП использовали мЭВ, нагруженные антиоксидантным белком каталазой и проходившие через ГЭБ после интраназального введения [90]. Чтобы преодолеть ГЭБ, мЭВ модифицировали с использованием мозгонаводящихся пептидов (brain homing peptides), направленных на связывание с эндотелием ГЭБ. Кроме того, полученные из наивных макрофагов мЭВ содержат поверхностные белки (антиген 1, ассоциированный с функцией лимфоцитарного интегрина (LFA-1), внутриклеточные молекулы адгезии (ICAM 1), углевод-связывающие рецепторы лецитина С-типа), которые также связываются с ВМЕС [84]. ЭК капилляров мозга экспрессируют на своей поверхности рецепторы трансферрина (РТФ), поэтому декорирование мЭВ трансферрином в качестве лиганда этих рецепторов облегчало транспорт таких мЭВ через ГЭБ путем транцитоза [91]. Усиление экспрессии РТФ на ВМЕС при инсульте стимулировало перенос энкефалина в мозг с помощью мЭВ, проникающих через ГЭБ [92]. Декорированные фолатом мЭВ также направляются в паренхиму мозга через ГЭБ при участии эндоцитоза, связываясь с экспрессируемыми на ВМЕС ГЭБ рецепторами фолиевой кислоты [60]. Нацеливания лекарственных средств на ЭК ГЭБ можно добиться с помощью полученных из мезенхимальных стволовых клеток мЭВ, модифицированных гликопротеином вируса бешенства (RVG). Такие мЭВ взаимодействуют с рецепторами ацетилхолина, присутствующими на поверхности ЭК ГЭБ [93].

Все вышесказанное указывает на то, что мЭВ представляют собой эффективные переносчики нейротропных фармацевтических соединений благодаря способности проникать через биологические барьеры (в том числе ГЭБ). Однако оптимизация процесса поступления мЭВ в паренхиму мозга через ГЭБ является непростой задачей. Чтобы способствовать более эффективной доставке мЭВ в мозг с использованием транцитоза, мЭВ приходится подвергать дополнительным усовершенствованиям, используя методы прямой биохимической или физической модификации мембранных поверхностей, а также модификации с помощью генной инженерии клеток, продуцирующих мЭВ [94–96].

С помощью методов генной инженерии можно создать в клетках фабрики по производству мЭВ заранее спроектированной конструкции, да еще к тому же нагруженных определенными белками. Например, показана возможность доставлять короткую интерферирующую РНК (short interfering РНК, siРНК) в мозг мыши с помощью мЭВ [97]. Для снижения иммуногенности мЭВ авторы получали их из дендритных клеток тех же животных. Путем генетического инжиниринга достигалась совместная экспрессия мембранного белка экзосом Lamp2b и пептида нейрон-специфического гликопротеина вируса бешенства (Rabies Virus Glycoprotein (RVG)-peptide) в дендритных клетках. Затем очищенные мЭВ нагружали siРНК к специфичной для клеток головного мозга изоформе GAPDH (глицеральдегид-3 фосфат дегидрогеназа) и вводили внутривенно, что приводило к нокдауну специфического гена этого белка. В результате достигалось значительное снижение экспрессии бета секретазы BACE1 — терапевтической мишени при моделировании БА у мышей.

Биохимический инжиниринг мЭВ, по сравнению с генетическим, проще, оперативнее и не требует долговременных модификаций клеток-продуцентов [89]. Активный RMT в мозг инициировали, модифицируя поверхность ЭкС несколькими биохимическими способами [98]. Для этой цели использовали, в частности, пептид T7, способный взаимодействовать с РТФ, не нарушая его связи с трансферрином [91]. После конъюгирования пептида T7 с Lamp2b (белком экзосомной мембраны) модифицированные таким образом мЭВ после внутривенного введения гораздо активнее, чем немодифицированные, достигали клеток внутричерепной глиобластомы у крыс. Для другого вида RMT, с участием LDL-R, использовали мЭВ, меченные АРОВ путем его конъюгирования с тетраспанином CD9, трансмембранным белком, экспрессируемым на мембране мЭВ [95]. Для идентификации мЭВ, как связанных, так и не связанных с АРОВ (CD9 и CD9-АРОВ), использовали, соответственно, флуоресцентные зонды с зеленой (DiD) и голубой (DiO) флуоресценцией. Оказалось, что после внутривенного введения в коре головного мозга мышей интенсивно накапливаются и длительно удерживаются мЭВ CD9-АРОВ, тогда как мЭВ CD9 не обнаруживаются.

Физический инжиниринг сохраняет химическую стабильность поверхности модифицируемых мЭВ, используя ультразвук и электропорацию, которые стимулируют нагрузку этих наночастиц терапевтическим материалом и не изменяют их биологических свойств [99, 100]. В одной из работ с целью оптимизации целенаправленной доставки в мозг наночастицы золота (AuNPs) комбинировали с нейрон-ориентированными мЭВ, полученными из подвергнутых генетической инженерии клеток линии НЕК293Т. Такие модифицированные ком-

плексы успешно связывались с клетками мозга *in vitro* и активно проникали через ГЭБ, накапливаясь в мозге мыши после внутривенного введения [101].

Следует отметить, что мЭВ из мезенхимальных стволовых и иммунных клеток могут проходить сквозь ГЭБ и без модификации их поверхности. Так, мЭВ из гипоксической клеточной линии глиобластомы U87 способствуют пролиферации ВМЕС и вызывают повышение проницаемости ГЭБ, опосредуемое сосудистым эндотелиальным ростовым фактором-А (VEGF-A) вследствие уменьшения экспрессии белков плотных межклеточных контактов клаудина-5 и окклюдина [102]. Полагают, что мЭВ, несущие только определенный поверхностный белок интегрин, проникают через ГЭБ и эффективно воздействуют на ткани опухоли. Показано пересечение ГЭБ мЭВ, модифицированными целевым пептидом нейропиплин-1-аргинин-глицин-глутаминовой кислотой (RGE) [103]. То же показано относительно нагруженных куркумином мЭВ, конъюгированных с аргинил-глицил-аспарагиновой кислотой (RGD), при лечении ишемии головного мозга [104]. Обнаружено, что тетраспанин CD9 на поверхности мЭВ взаимодействует с поверхностным гликопротеином на клетках-мишенях и способствует слиянию мЭВ с клеточной мембраной, ускоряя прямую цитозольную доставку гена [105]. Кроме того, предполагают, что мЭВ, компартментализуясь в мультивезикулярные тельца и перемещаясь в них от одной клетки к другой, могут проходить через несколько уровней ГЭБ [82, 106].

Все сказанное выше подтверждает обоснованность попыток использования мЭВ в качестве транспортного средства нового поколения. Все исследованные на настоящий момент наноразмерные частицы (липосомы, наномицеллы, наночастицы металлов и т.д.) были каждая в свое время отличными кандидатами на роль переносчиков лекарственных препаратов через ГЭБ. Однако по разным причинам разработка этих нанокандидатов к полномасштабному прорыву в этой области не привела. Попытки найти новые необычные средства доставки лекарств в мозг еще продолжают, но, кажется, мЭВ способны полностью удовлетворить все потребности в транспортных средствах типа кровь—мозг. Отличительные качества мЭВ хорошо известны. Эти частицы имеют биологическое происхождение и не вызывают ответа макрофагов в организме. Они содержат на мембране лиганды, позволяющие связываться с ЭК ГЭБ. Уникальные свойства мЭВ, окончательно еще не выясненные, позволяют им проходить сквозь слой ЭК. Так что не стоит удивляться, если в самое ближайшее время появятся лекарственные препараты на основе или с использованием мЭВ в качестве транспортеров в мозг. А самые мотивированные оптимисты

могут надеяться, что такие препараты откроют новую эру в лечении заболеваний головного мозга.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Государственными заданиями Института ВНД и НФ РАН и Научного центра неврологии Минобрнауки РФ

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Busatto S., Morad G., Guo P., Moses M.A. // *FASEB Bioadv.* 2021. V. 3. P. 665–675.
- Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. et al. // *J. Extracell. Ves.* 2018. V. 7. № 1. 1535750
- Kapogiannis D., Mustapic M., Shardell M.D., Berkowitz S.T., Diehl T.C., Spangler R.D., Tran J., Lazaropoulos M.P., Chawla S., Gulyani S. // *JAMA Neurol.* 2019. V. 76. № 11. P. 1340–1351.
- Mustapic M., Eitan E., Werner J.K., Berkowitz S.T., Lazaropoulos M.P., Tran J., Goetzl E.J., Kapogiannis D. // *Front. Neurosci.* 2017. V. 11. 278.
- Winston C.N., Goetzl E.J., Akers J.C., Carter B.S., Rockenstein E.M., Galasko D., Masliah E., Rissman R.A. // *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring.* 2016. V. 3. P. 63–72.
- Goetzl E.J., Kapogiannis D., Schwartz J.B., Lobach I.V., Goetzl L., Abner E.L., Jicha G.A., Karydas A.M., Boxer A., Miller B.L. // *FASEB J.* 2016. V. 30. № 12. P. 4141–4148.
- Fiandaca M.S., Kapogiannis D., Mapstone M., Boxer A., Eitan E., Schwartz J.B., Abner E.L., Petersen R.C., Federoff H.J., Miller B.L. // *Alzheimer's Dem.* 2015. V. 11. № 6. P. 600–607.
- Ardashirova N.S., Fedotova E.Yu., Illarionovskiy S.N. // *Neurochem. J.* 2020. V. 14. № 2. P. 127–132.
- Shi M., Liu C., Cook T.J., Bullock K.M., Zhao Y., Gingham C., Li Y., Aro P., Dator R., He C. // *Acta Neuropath.* 2014. V. 128. № 5. P. 639–650.
- Shi M., Kovac A., Korff A., Cook T.J., Gingham C., Bullock K.M., Yang L., Stewart T., Zheng D., Aro P. // *Alzheimer's & Dementia.* 2016. V. 12. № 11. P. 1125–1131.
- Hamlett E.D., Goetzl E.J., Ledreux A., Vasilevko V., Boger H.A., LaRosa A., Clark D., Carroll S.L., Carmona-Iragui M., Fortea J. // *Alzheimer's & Dementia.* 2017. V. 13. № 5. P. 541–549.
- Sproviero D., la Salvia S., Giannini M., Crippa V., Gagliardi S., Bernuzzi S., Diamanti L., Ceroni M., Pansarasa O., Poletti A. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. 487.
- Ivanova M.V., Chekanova E.O., Belugin B.V., Dolzhikova I.V., Tutykhina I.L., Zakharova M.N. // *Neurochem. J.* 2020. V. 14. № 3. P. 321–327.
- Martinez B., Peplow P.V. // *Neural Regeneration Res.* 2020. V. 15. № 4. P. 606–619.
- Mycko M.P., Baranzini S.E. // *Mult. Sclerosis J.* 2020. V. 26. № 5. P. 599–604.
- Ebrahimkhani S., Beadnall H.N., Wang C., Suter C.M., Barnett M.H., Buckland M.E., Vafaei F. // *Mol. Neurobiol.* 2020. V. 57. № 2. P. 1245–1258.
- Xin H., Wang F., Li Y., Lu Q.-E., Cheung W.L., Zhang Y., Zhang Z.G., Chopp M. // *Cell Transpl.* 2017. V. 26. № 2. P. 243–257.
- Chen Y., Song Y., Huang J., Qu M., Zhang Y., Geng J., Zhang Z., Liu J., Yang G.-Y. // *Front. Neurol.* 2017. V. 8. 57.
- Song Y., Li Z., He T., Qu M., Jiang L., Li W., Shi X., Pan J., Zhang L., Wang Y. // *Theranostics.* 2019. V. 9. № 10. P. 2910–2923.
- Yakovlev A.A. // *Neurochem. J.* 2022. V. 16. № 2. P. 121–129.
- Choi J., Kim S.Y., Kim H., Lim B.C., Hwang H., Chae J.H., Kim K.J., Oh S., Kim E.Y., Shin J.-S. // *BMC Neurol.* 2020. V. 20. № 1. P. 85.
- Kumar S., Vijayan M., Bhatti J.S., Reddy P.H. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. 146:47–94.
- Nasca C., Dobbin J., Bigio B., Watson K., de Angelis P., Kautz M., Cochran A., Mathé A.A., Kocsis J.H., Lee F.S. // *Mol. Psychiatry.* 2021. V. 26. № 9. P. 5140–5149.
- Gruzdev S.K., Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2019. V. 39. № 6. P. 729–750.
- Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Nikolaev R.V., Kuznetsova V.E., Gruzdev S.K., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. № 4. P. 385–390.
- Ceylan D., Tufekci K.U., Keskinoglu P., Genc S., Ozerdem A. // *J. Affect. Dis.* 2020. V. 262. P. 99–107.
- Amoah S.K., Rodriguez B.A., Logothetis C.N., Chander P., Sellgren C.M., Weick J.P., Sheridan S.D., Jantzie L.L., Webster M.J., Mellios N. // *Neuropsychopharmacology.* 2020. V. 45. № 4. P. 656–665.
- Ma Y., Li C., Huang Y., Wang Y., Xia X., Zheng J.C. // *Cell Comm. Signal.* 2019. V. 17. № 1. 96.
- Sharma G., Modgil A., Layek B., Arora K., Sun C., Law B., Singh J. // *J. Control. Release.* 2013. V. 167. № 1. P. 1–10.
- Gómez-Molina C., Sandoval M., Henzi R., Ramírez J.P., Varas-Godoy M., Luarte A., Lafourcade C.A., Lopez-Verrilli A., Smalla K.H., Kaehne T. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2019. V. 22. № 3. P. 232–246.
- Belhadj Z., He B., Deng H., Song S., Zhang H., Wang X., Dai W., Zhang Q. // *J. Extracell. Ves.* 2020. V. 9. № 1. 1806444.
- Kamerkar S., Lebleu V.S., Sugimoto H., Yang S., Ruivo C.F., Melo S.A., Lee J.J., Kalluri R. // *Nature.* 2017. V. 546. № 7659. P. 498–503.
- Shi M., Sheng L., Stewart T., Zabetian C.P., Zhang J. // *Prog. Neurobiol.* 2019. V. 175. P. 96–106.
- Banks W.A., Sharma P., Bullock K.M., Hansen K.M., Ludwig N., Whiteside T.L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 12. P. 1–21.

* Адресат для корреспонденции: 117485 Москва, ул. Бутлерова, 5а, e-mail: al_yakovlev@ihna.ru.

35. Tkach M., Théry C. // *Cell*. 2016. V. 164. № 6. P. 1226–1232.
36. Patil S.M., Sawant S.S., Kunda N.K. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2020. V. 154. P. 259–269.
37. Heidarzadeh M., Gürsoy-Özdemir Y., Kaya M., Eslami Abriz A., Zarebkohan A., Rahbarghazi R., Sokullu E. // *Cell Biosci.* 2021. V. 11. № 1. 142.
38. Dardet J.P., Serrano N., Andrés I.E., Toborek M. // *Front. Drug Deliv.* 2022. V. 2.
39. Kalluri R., LeBleu V.S. // *Science*. 2020. V. 367. № 6478. eaau6977.
40. Matsumoto J., Stewart T., Banks W.A., Zhang J. // *Curr. Pharm. Des.* 2017. V. 23. № 40. P. 6206–6214.
41. Tian T., Zhu Y.-L., Hu F.-H., Wang Y.-Y., Huang N.-P., Xiao Z.-D. // *J. Cell. Physiol.* 2013. V. 228. № 7. P. 1487–1495.
42. Toth A.E., Holst M.R., Nielsen M.S. // *Curr. Pharm. Des.* 2020. V. 26. № 13. P. 1405–1416.
43. Haqqani A.S., Thom G., Burrell M., Delaney C.E., Brunette E., Baumann E., Sodja C., Jezierski A., Webster C., Stanimirovic D.B. // *J. Neurochem.* 2018. V. 146. № 6. P. 735–752.
44. Patel M.M., Patel B.M. // *CNS Drugs*. 2017. V. 31. № 2. P. 109–133.
45. Banks W.A., Sharma P., Bullock K.M., Hansen K.M., Ludwig N., Whiteside T.L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 12. P. 1–21.
46. Saint-Pol J., Gosselet F., Duban-Deweier S., Pottiez G., Karamanos Y. // *Cells*. 2020. V. 9. № 4. 851.
47. Krämer-Albers E.-M., Bretz N., Tenzer S., Winterstein C., Möbius W., Berger H., Nave K.-A., Schild H., Trotter J. // *Proteomics Clin. Appl.* 2007. V. 1. № 11. P. 1446–1461.
48. Wang G., Dinkins M., He Q., Zhu G., Poirier C., Campbell A., Mayer-Proschel M., Bieberich E. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 25. P. 21384–21395.
49. Xin H., Li Y., Buller B., Katakowski M., Zhang Y., Wang X., Shang X., Zhang Z.G., Chopp M. // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 7. P. 1556–1564.
50. Zhang Y., Kim M.S., Jia B., Yan J., Zuniga-Hertz J.P., Han C., Cai D. // *Nature*. 2017. V. 548. № 7665. P. 52–57.
51. Fitzner D., Schnaars M., van Rossum D., Krishnamoorthy G., Dibaj P., Bakhti M., Regen T., Hanisch U.-K., Simons M. // *J. Cell Sci.* 2011. V. 124. № 3. P. 447–458.
52. Frühbeis C., Fröhlich D., Kuo W.P., Amphornrat J., Thilemann S., Saab A.S., Kirchhoff F., Möbius W., Goebels S., Nave K.-A. // *PLoS Biol.* 2013. V. 11. № 7. e1001604.
53. Morel L., Regan M., Higashimori H., Ng S.K., Esau C., Vidensky S., Rothstein J., Yang Y. // *J. Biol. Chemistry*. 2013. V. 288. № 10. P. 7105–7116.
54. Frühbeis C., Fröhlich D., Kuo W.P., Krämer-Albers E.-M. // *Front. Cell. Neurosci.* 2013. V. 7. 182.
55. Budnik V., Ruiz-Cañada C., Wendler F. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2016. V. 17. № 3. P. 160–172.
56. Fitzner D., Schnaars M., van Rossum D., Krishnamoorthy G., Dibaj P., Bakhti M., Regen T., Hanisch U.-K., Simons M. // *J. Cell Sci.* 2011. V. 124. № 3. P. 447–458.
57. Budnik V., Ruiz-Cañada C., Wendler F. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2016. V. 17. № 3. P. 160–172.
58. Fauré J., Lachenal G., Court M., Hirrlinger J., Chatelard-Causse C., Blot B., Grange J., Schoehn G., Goldberg Y., Boyer V. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2006. V. 31. № 4. P. 642–648.
59. Zhang J., Li S., Li L., Li M., Guo C., Yao J., Mi S. // *Genom. Proteom. Bioinform.* 2015. V. 13. № 1. P. 17–24.
60. Shetgaonkar G.G., Marques S.M., DCruz C.E.M., Vibhavari R.J.A., Kumar L., Shirodkar R.K. // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2022. V. 12. № 5. P. 1047–1079.
61. Qu M., Lin Q., Huang L., Fu Y., Wang L., He S., Fu Y., Yang S., Zhang Z., Zhang L. // *J. Control. Release*. 2018. V. 287. P. 156–166.
62. Morad G., Carman C.V., Hagedorn E.J., Perlin J.R., Zon L.I., Mustafaoglu N., Park T.-E., Ingber D.E., Daisy C.C., Moses M.A. // *ACS Nano*. 2019. V. 13. № 12. P. 13853–13865.
63. Pulgar V.M. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 12. 1019
64. Terstappen G.C., Meyer A.H., Bell R.D., Zhang W. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. V. 20. № 5. P. 362–383.
65. Azarmi M., Maleki H., Nikkam N., Malekinejad H. // *Int. J. Pharm.* 2020. V. 586. 119582.
66. Uchida Y., Ohtsuki S., Katsukura Y., Ikeda C., Suzuki T., Kamiie J., Terasaki T. // *J. Neurochem.* 2011. V. 117. № 2. P. 333–345.
67. Zuchero Y.J.Y., Chen X., Bien-Ly N., Bumbaca D., Tong R.K., Gao X., Zhang S., Hoyte K., Luk W., Huntley M.A. // *Neuron*. 2016. V. 89. № 1. P. 70–82.
68. Karatas H., Aktas Y., Gursoy-Ozdemir Y., Bodur E., Yemisci M., Caban S., Vural A., Pinarbasli O., Capan Y., Fernandez-Megia E. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 44. P. 13761–13769.
69. Sonoda H., Morimoto H., Yoden E., Koshimura Y., Kinoshita M., Golovina G., Takagi H., Yamamoto R., Minami K., Mizoguchi A. // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 5. P. 1366–1374.
70. Spencer B.J., Verma I.M. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. V. 104. № 18. P. 7594–7599.
71. Wagner S., Zensi A., Wien S.L., Tschickardt S.E., Maier W., Vogel T., Worek F., Pietrzik C.U., Kreuter J., von Briesen H. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e32568.
72. Spencer B., Trinh I., Rockenstein E., Mante M., Florio J., Adame A., El-Agnaf O.M.A., Kim C., Masliah E., Rissman R.A. // *Neurobiol. Dis.* 2019. V. 127. P. 163–177.
73. Zhang W., Liu Q.Y., Haqqani A.S., Leclerc S., Liu Z., Fauteux F., Baumann E., Delaney C.E., Ly D., Star A.T. // *Fluids Barriers CNS*. 2020. V. 17. № 1. 47.
74. Pardridge W.M., Kang Y.-S., Buciak J.L., Yang J. // *Pharm. Res.* 1995. V. 12. № 6. P. 807–816.
75. Boado R.J., Pardridge W.M. // *Mol. Pharmaceutics*. 2017. V. 14. № 4. P. 1271–1277.
76. Pardridge W.M., Boado R.J., Giugliani R., Schmidt M. // *BioDrugs*. 2018. V. 32. № 2. P. 169–176.
77. Feral C.C., Nishiya N., Fenczik C.A., Stuhlmann H., Slepak M., Ginsberg M.H. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. V. 102. № 2. P. 355–360.
78. Xie F., Xie F., Qin, Yuan, Tang, Zhang, Fan, Chen, Hai, Yao, et al. // *Int. J. Nanomedicine*. 2012. V. 7. P. 163–175.
79. Guo Y., Zhang Y., Li J., Zheng Y., Lu Y., Jiang X., He X., Ma H., An S., Jiang C. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V. 7. № 9. P. 5444–5453.

80. Webb R.L., Kaiser E.E., Scoville S.L., Thompson T.A., Fatima S., Pandya C., Sriram K., Swetenburg R.L., Vaidhavan K., Arbab A.S. // *Transl. Stroke Res.* 2018. V. 9. № 5. P. 530–539.
81. Yang T., Martin P., Fogarty B., Brown A., Schurman K., Phipps R., Yin V.P., Lockman P., Bai S. // *Pharm. Res.* 2015. V. 32. № 6. P. 2003–2014.
82. Record M., Subra C., Silvente-Poirot S., Poirot M. // *Biochem. Pharmacol.* 2011. V. 81. № 10. P. 1171–1182.
83. Chen C.C., Liu L., Ma F., Wong C.W., Guo X.E., Chacko J.V., Farhoodi H.P., Zhang S.X., Zimak J., Ségaliny A. // *Cell. Mol. Bioengineering.* 2016. V. 9. № 4. P. 509–529.
84. Yuan D., Zhao Y., Banks W.A., Bullock K.M., Haney M., Batrakova E., Kabanov A.V. // *Biomaterials.* 2017. V. 142. P. 1–12.
85. Hu G.W., Li Q., Niu X., Hu B., Liu J., Zhou S.M., Guo S.C., Lang H.L., Zhang C.Q., Wang Y. // *Stem Cell Res. Ther.* 2015. V. 6. № 1. 10.
86. Zhou W., Fong M.Y., Min Y., Somlo G., Palomares M.R., Yu Y., Chow A., O'Connor S., Chin A.R. // *Cancer Cell.* 2014. V. 25. № 4. P. 501–515.
87. Pivoraitė U., Jarmalavičiūtė A., Tunaitis V., Ramanauskaitė G., Vaitkuvienė A., Kašėta V., Bizjulevičienė G., Venalis A., Pivoriūnas A. // *Inflammation.* 2015. V. 38. № 5. P. 1933–1941.
88. Wardlaw J.M., Doubal F.N., Valdes-Hernandez M., Wang X., Chappell F.M., Shuler K., Armitage P.A., Carpenter T.C., Dennis M.S. // *Stroke.* 2013. V. 44. № 2. P. 525–527.
89. Xu B., Zhang Y., Du X.-F., Li J., Zi H.-X., Bu J.-W., Yan Y., Han H., Du J.-L. // *Cell Res.* 2017. V. 27. № 7. P. 882–897.
90. Haney M.J., Klyachko N.L., Zhao Y., Gupta R., Plotnikova E.G., He Z., Patel T., Piroyan A., Sokolsky M., Kabanov A.V. // *J. Control. Release.* 2015. V. 207. P. 18–30.
91. Kim G., Kim M., Lee Y., Byun J.W., Hwang D.W., Lee M. // *J. Control. Release.* 2020. V. 317. P. 273–281.
92. Liu Y., Fu N., Su J., Wang X., Li X. // *BioMed Res. Int.* 2019. V. 2019. 4273290.
93. Cui G.-H., Wu J., Mou F.-F., Xie W.-H., Wang F.-B., Wang Q.-L., Fang J., Xu Y.-W., Dong Y.-R., Liu J.-R. // *FASEB J.* 2018. V. 32. № 2. P. 654–668.
94. Xu M., Feng T., Liu B., Qiu F., Xu Y., Zhao Y., Zheng Y. // *Theranostics.* 2021. V. 11. № 18. P. 8926–8944.
95. Choi H., Choi K., Kim D.-H., Oh B.-K., Yim H., Jo S., Choi C. // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 3. 672.
96. Malekian F., Shamsian A., Kodam S.P., Ullah M. // *J. Physiol.* 2022. May 16. <https://doi.org/10.1113/JP282799>
97. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhal S., Wood M.J.A. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 4. P. 341–345.
98. Salunkhe S., Dheeraj, Basak M., Chitkara D., Mittal A. // *J. Control. Release.* 2020. V. 326. P. 599–614.
99. Gopalan D., Pandey A., Udupa N., Mutalik S. // *J. Control. Release.* 2020. V. 319. P. 183–200.
100. Xu R., Greening D.W., Chen M., Rai A., Ji H., Takahashi N., Simpson R.J. // *Proteomics.* 2019. V. 19. № 8. e1900121.
101. Khongkow M., Yata T., Boonrungsiman S., Ruktanonchai U.R., Graham D., Namdee K. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. 8278.
102. Zhao C., Wang H., Xiong C., Liu Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 502. № 3. P. 324–331.
103. Jia G., Han Y., An Y., Ding Y., He C., Wang X., Tang Q. // *Biomaterials.* 2018. V. 178. P. 302–316.
104. Tian T., Zhang H.X., He C.P., Fan S., Zhu Y.L., Qi C., Huang N.P., Xiao Z.D., Lu Z.H., Tannous B.A. // *Biomaterials.* 2018. V. 150. P. 137–149.
105. Alyautdin R., Khalin I., Nafeeza M.I., Haron M.H., Kuznetsov D. // *Int. J. Nanomedicine.* 2014. V. 9. № 1. P. 795–811.
106. El-Andaloussi S., Lee Y., Lakhal-Littleton S., Li J., Seow Y., Gardiner C., Alvarez-Erviti L., Sargent I.L., Wood M.J.A. // *Nat. Prot.* 2012. V. 7. № 12. P. 2112–2126.

Outlooks of Using Small Extracellular Vesicles as a Transport Vehicle through the Blood–Brain Barrier

L. G. Khaspekova^a and A. A. Yakovlev^{b, c}

^aResearch Center of Neurology, Moscow, Russia

^bInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

^cScientific and Practical Psychoneurological Center named after Z.P. Solovyov DZM, Moscow, Russia

The review summarizes the results of recent studies on the mechanisms mediating the crossing by small extracellular vesicles through blood-brain barrier (BBB). The kinds of vesicular transport through the BBB, including receptor-mediated and adsorptive-mediated transcytosis, are considered. The possibilities of optimizing the penetration of vesicles into the parenchyma of the brain through the BBB are shown.

Keywords: blood-brain barrier, small extracellular vesicles, transcytosis, endothelial cells of brain vessels

БИОХИМИЧЕСКИЕ ТРОМБОЦИТАРНЫЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2023 г. А. Н. Козинцев^{1, 2, 3, *}, Н. В. Изможерова^{1, 2, 3}, А. А. Попов^{1, 2, 3},
Л. И. Волкова³, И. П. Антропова^{1, 2, 3}, А. В. Рябинина^{1, 2}

¹Институт высокотемпературной электрохимии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

²Поликлиника ИВТЭ УрО РАН, Екатеринбург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Уральский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию 20.06.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 29.06.2022 г.

Увеличение распространенности когнитивных нарушений различной этиологии, в том числе болезни Альцгеймера (БА), определяет актуальность поиска методов ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний, в связи с чем продолжается активное изучение различных периферических биомаркеров, оценка которых должна осуществляться стандартизированными методами, доступными в реальной клинической практике. В связи с развитием гипотезы о схожести биохимических и физиологических процессов в тромбоцитах и нейронах, все больше внимания уделяется изучению возможности использования различных структурно-функциональных тромбоцитарных параметров в качестве биомаркеров ряда заболеваний нервной системы. В данном обзоре рассматриваются основные характеристики тромбоцитов при развитии когнитивных нарушений: анализируются периферические аспекты амилоидогенеза и образования тау-белка, изменения в синтезе и метаболизме различных активных веществ, регуляция микроРНК, а также дисфункция ферментов и белков, которые могут быть использованы для создания диагностических тестов с целью раннего выявления БА.

Ключевые слова: биомаркеры, тромбоциты, когнитивные нарушения, болезнь Альцгеймера

DOI: 10.31857/S1027813323010107, **EDN:** EPGCWL

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты – безъядерные клетки крови, играющие важнейшую роль в осуществлении гемостаза и купировании кровотечения в области повреждения сосудов [1]. В последние годы сформулирована гипотеза, что тромбоциты являются “циркулирующими зеркалами нейронов”, что позволяет рассматривать данные клетки в качестве периферической диагностической матрицы нейродегенеративных заболеваний и активных участников процессов нейровоспаления [2].

Целью настоящей работы явилась оценка современного состояния проблемы клинической и прогностической значимости лабораторных маркеров, ассоциированных со структурой и функцией тромбоцитов. В обзоре рассматриваются изменения основных показателей функционирования тромбоцитов при развитии когнитивных нарушений, преимущественно при болезни Альцгеймера (БА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Критериями включения статьи в обзор являлись: полнотекстовые статьи на английском языке, представляющие собой оригинальные обзорно-аналитические и экспериментальные исследования, а также мета-анализы, нарративные и систематические обзоры, посвященные изучению изменений различных тромбоцитарных параметров при болезни Альцгеймера.

Подготовка обзора осуществлялась с использованием базы Medline через интерфейс Pubmed, Google Scholar, Cochrane Library и базы SCOPUS. Для поиска необходимых статей использовались ключевые слова: platelets, Alzheimer disease, diagnosis, biomarker, marker. Основная поисковая фраза: platelet* AND diagnos* AND (Alzheimer* OR AD) AND (biomarker* OR marker*). Дополнительные фильтры “English”, “Human”. Поиск в Pubmed осуществлялся с помощью MeSH терминов и подраздела Title/Abstract. При поиске в подразделе Title/Abstract было найдено – 93 ссылки с 1992 г. по 2022 г. При поиске с использованием MeSH

* Адресат для корреспонденции: Екатеринбург, 620075, ул. Луначарского, 182, e-mail: antonkodintsev@mail.ru.

терминов было найдено — 83 ссылки с 1985 г. по 2022 г. Для повышения точности дополнительно использовались поисковые фильтры “diagnosis” и “review” с оптимальным балансом чувствительности/специфичности, разработанные университетом МакМастера. По результатам поиска в Google Scholar было найдено — 18300 ссылок, опубликованных до 2022 года. В базе SCOPUS было найдено 205 работ, опубликованных с 1988 года по 2022 г. В базе Cochrane Library было найдено 50 публикаций в период с 1985 года по 2021 год. В связи с релевантностью в обзор была включена одна статья на русском языке.

После исключения дублирующих публикаций и исследований, не соответствующих целям работы и критериям включения, осталось 66 релевантных публикаций, включенных в настоящий обзор. Часть работ являются систематическими обзорами и мета-анализами, в связи с чем рассматривался совокупный результат, включенных в данные работы первичных исследований в целях предотвращения дублирования информации.

Для стандартизации и валидации обзора использовался чек-лист SANRA [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени в тромбоцитах обнаружено более 3700 белков, участвующих не только в процессах свертывания крови, но и в воспалительном ответе, защитных механизмах и межклеточных взаимодействиях. В тромбоцитах содержится шероховатый эндоплазматический ретикулум, полирибосомы и стабильные мегакариоцитарные мРНК транскрипты, образовавшиеся в ходе тромбопоэза. Также обнаружено 284 образца микроРНК, регулирующих экспрессию белков путем парных взаимодействий. Тромбоциты являются главным источником экстравезикул (10–90%) в периферической крови. В зависимости от патологического процесса в тромбоцитах происходят быстрые функциональные изменения и адаптация их фенотипа, что обусловлено регуляторным влиянием мРНК и широким набором белков [4].

Активация тромбоцитов и их адгезия на сосудистой стенке способствуют мобилизации лейкоцитов с формированием перифокального воспаления и последующим распространением на структуры нервной системы. Повышение активности тромбоцитов ассоциируется с прогрессированием стеноза каротидных сосудов и, как следствие, с увеличением риска гипоперфузии, являющейся потенциальным фактором риска БА [5].

Обсуждается потенциальная нейропротективная роль тромбоцитов, их участие в поддержании гомеостаза и пластичности нейронов путем модулирования нейрогенеза, стимуляции образования новых синапсов и регенерации аксонов в месте повреждения [6, 7]. Таким образом, тромбоциты могут способствовать процессам нейродегенера-

ции за счет усиления цереброваскулярной дисфункции и активации нейровоспаления, но, в то же время, оказывать нейропротекторный эффект благодаря регуляции регенеративных процессов путем секреции большого количества активных соединений.

При этом не известно, являются ли тромбоцитарные функциональные и морфологические изменения звеном патогенеза нейродегенеративных заболеваний или представляют собой следствие их прогрессирования. Сложность и комплексность всех биохимических реакций затрудняет выявление специфических маркеров для определенного типа патологического процесса [8]. Однако, изменение концентрации продуктов и субстратов данных реакций может использоваться в качестве биомаркеров отдельных заболеваний, в частности для верификации этиологии когнитивных нарушений с целью разработки новых и более эффективных методов терапии, а также для повышения точности диагностики.

Оценка прогностической ценности структурно-функциональных изменений тромбоцитов в условиях развития дегенеративных заболеваний нервной системы позволяет определить наиболее перспективные направления первичной и дифференциальной диагностики БА, деменции в тельцами Леви, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза, прионных заболеваний и т.д. [8].

Изменение концентрации компонентов амилоидогенеза. Наиболее распространенным типом деменции (от 50 до 75%) является болезнь Альцгеймера, в основе патогенеза которой лежит формирование сенильных бляшек из нерастворимого бета-амилоида 42 и нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного тау-белка [9].

Метаболизм белка предшественника амилоида (A β PP) в тромбоцитах и нейронах может происходить как через неамилоидогенный путь (фермент ADAM10 — металлопротеаза 10), так и с формированием нерастворимых агрегатов A β 42 (BACE1 — бета-секретаза, PSEN1, PSEN2 — гамма-секретазы), то есть путем амилоидогенеза [10]. Нарушение функционирования ферментов-секретаз и активация амилоидогенеза обуславливается мутациями в генах A β PP, PSEN1 и PSEN2, ассоциированными с развитием наследственных форм болезни Альцгеймера, в том числе с ранней клинической манифестацией [11]. Таким образом, обнаружение дисфункции ферментов, кодируемых данными генами в тромбоцитах, представляет интерес для прогнозирования риска развития и диагностики ранней стадии БА.

Изменение концентрации A β PP секретаз (ADAM10, BACE1 и PSEN1) в тромбоцитах позволяет достоверно выявлять пациентов с БА. ROC-анализ показателей всех трех секретаз (AUC — 0.90, чувствительность — 88.9%, специфичность — 66.7%, $p = 0.003$) у 20 пациентов с БА и у 20 здоровых добровольцев, подтвердил, что

тромбоциты являются достоверным биологическим маркером БА. В среднем у пациентов с БА наблюдалось снижение ADAM10 на 52.5%, $p < 0.0001$ и PSEN1 на 32%, $p = 0.02$. Было выявлено, что изменение концентрации AβPP секретаза в лейкоцитах статистически недостоверно и не обладало таким же дискриминационным эффектом (AUC — 0.65, чувствительность — 77.8%, специфичность — 50.0%, $p = 0.2$) [12]. Уменьшение концентрации тромбоцитарной ADAM10 позволяет дифференцировать пациентов с умеренными когнитивными нарушениями (УКН) и здоровых респондентов в возрасте 60 лет и старше с чувствительностью — 73.9% и специфичностью — 72.7% [13].

Изменение экспрессии бета-секретазы 1 в тромбоцитах соответствует морфологическим и ликворным характеристикам болезни Альцгеймера [14]. Более того, использование селективного ингибитора ацетилхолинэстеразы донепезила (5 мг в сутки — 4 недели с последующим повышением дозы до 10 мг в сутки) в течение 6 месяцев приводит к снижению концентрации тромбоцитарной бета-секретазы 1, что может свидетельствовать о модифицирующем эффекте препарата и потенциальном использовании данного показателя в качестве лабораторного мониторинга эффективности терапии [15].

Таким образом, использование оценки активности трех секретаз: ADAM10, BACE1, и PSEN1 в качестве биомаркеров позволяет с высокой точностью диагностировать болезнь Альцгеймера, а изолированная оценка ADAM10 — дифференцировать пациентов с умеренными когнитивными нарушениями. Мониторинг тромбоцитарной бета-секретазы 1 может использоваться в качестве косвенной лабораторной оценки эффективности терапии ингибиторами ацетилхолинэстеразы, однако, требуется уточнение корреляции изменений данного фермента с клинически значимыми параметрами.

Изменение концентрации предшественника белка амилоида (AβPP) и тау-белка. В связи с развитием гипотезы о “зеркальности” биохимических процессов в тромбоцитах и нейронах, предполагается, что изменение концентрации бета-амилоида и тау-белка при БА наблюдается не только в нервных клетках, но и в тромбоцитах, что может быть использовано в качестве периферического биомаркера данной патологии.

В комплексном обзоре Akingbade с соавт. проанализированы и оценены такие тромбоцитарные показатели как предшественник белка амилоида, AβPP секретазы (BACE1 и ADAM10), α-синуклеин, тау-белок, серотонин, холестерин, фосфолипазы, кластерин, IgG, поверхностные рецепторы, MAO-B и субпопуляция прокоагулянтных СОАТ (collagen-and-thrombin) тромбоцитов для диагностики деменции, в частности для выявления БА. На основе анализа опубликованных данных авторы пришли к выводу, что наиболее значимыми и перспективными для дальнейшего изучения маркерами

являются тау-белок, AβPP (особенно с учетом увеличения концентрации СОАТ тромбоцитов) и AβPP секретазы — ADAM10 и BACE1 [16].

СОАТ тромбоциты образуются вследствие двойной активации под воздействием коллагена и тромбина и представляют собой субпопуляцию активированных тромбоцитов, которые на своей поверхности сохраняют слой прокоагулянтных белков и экспрессируют фосфатидилсерин, поэтому их называют также “укутанные, coated” тромбоциты [17, 18]. Данная субпопуляция тромбоцитов обладает выраженным прокоагуляционным потенциалом и способностью экспрессировать более высокие концентрации AβPP на клеточной мембране по сравнению с клетками, которые активируются под воздействием только одного фактора: коллагена или тромбина [19].

В 2020 г. опубликованы результаты собственного исследования и мета-анализ Shi с соавт., в которых указывается на снижение тромбоцитарного соотношения AβPP в группе пациентов с амнестическим типом умеренных когнитивных нарушений (аУКН) по сравнению с контрольной группой: 0.64 ± 0.25 против 0.75 ± 0.24 , $p = 0.46$, а также на увеличение концентрации фосфорилированного тау-белка p231 в группе пациентов с аУКН: 1.68 ± 0.52 по сравнению с контрольной группой: 1.45 ± 0.57 , $p = 0.05$. Также было выявлено увеличение концентрации тау-белка с сайтом фосфорилирования Ser396/404 в группе аУКН: 2.27 ± 0.86 (контрольная группа: 1.82 ± 0.89) $p = 0.02$. В исследование было включено 43 пациента с аУКН и 45 здоровых добровольцев. Концентрация фосфорилированного тау-белка p181 в группах достоверно не различалась (группа аУКН: 1.44 ± 0.61 , контрольная группа: 1.44 ± 0.66 $p = 0.974$). Авторы выполнили ROC-анализ для фосфорилированного тау-белка p231 и Ser396/404 с последующим определением показателей чувствительности и специфичности. Для p231 AUC (площадь под кривой) составила 0.624 (95% ДИ: 0.506–0.741, $p < 0.05$), чувствительность = 90.7% и специфичность = 37.8% для порогового уровня — 1.030. Для Ser396/404 AUC = 0.657 (95% ДИ: 0.543–0.772, $p < 0.05$), чувствительность = 81.4% и специфичность = 51.1% для порогового уровня 1.628. Построенные модели на основе ROC-анализа с учетом показателей AUC в интервале от 0.6 до 0.7 можно охарактеризовать как удовлетворительные. На основании выполненного мета-анализа с учетом данных предшествующих исследований с схожим дизайном (всего 98 пациентов с УКН и 99 здоровых добровольцев), было обнаружено достоверное снижение концентрации AβPP тромбоцитов в группе УКН: стандартизованная средняя разница = -0.553 ; 95% ДИ: -0.930 , -0.175 ; $p = 0.004$; $I^2 = 40.7\%$). Публикационного смещения выявлено не было (Egger’s тест: $t = -0.50$, $p = 0.707$) [20].

Вышеприведенные данные подтверждены систематическим обзором 32 исследований (29 одно-

моментных и 3 — проспективных когортных работы), в котором у пациентов с БА наблюдалось значимое изменение метаболизма $A\beta$ PP по сравнению со здоровыми участниками исследований, однако чувствительность и специфичность данного показателя остаются недостаточно изученными [21].

Продолжает исследоваться прогностическая ценность соотношения различных типов тау-протеина. У пациентов с БА наблюдается статистически достоверное повышение соотношения высокомолекулярного (ВМК) тау-белка к низкомолекулярному (НМК). Более того, показатель данного соотношения коррелирует с степенью выраженностью атрофии левого медиального и правого переднего отделов поясной извилины, правого отдела мозжечка, таламуса и парагиппокампального региона, а также с уменьшением объема коры левой лобной доли. Изменение ВМК/НМК тау-белка взаимосвязаны с показателями оценки когнитивного статуса по шкале MMSE [22, 23].

Таким образом, можно сделать вывод о важной прогностической ценности дальнейшего изучения изменения концентрации $A\beta$ PP, тау-белка (в частности фосфорилированного тау-белка p231 и Ser396/404) и соотношения ВМК тау/НМК тау для разработки комплексных диагностических систем ранней диагностики БА.

Изменение активности циклооксигеназ и оксидативного стресса. Помимо изменения концентрации субстратов, образующихся вследствие амилоидогенного метаболизма, в тромбоцитах, изолированных из образцов крови пациентов с БА, также наблюдались изменения активности циклооксигеназы 1 и 2 (ЦОГ), цитохром с-оксидазы и моноаминоксидазы В [24]. В частности, в группе пациентов с БА выявлено увеличение активности тромбоцитарной ЦОГ-2 на 50% и на 25% у пациентов с умеренными когнитивными нарушениями по сравнению с контрольной группой [25]. Обнаруженные изменения сформировали предположение о возможной терапевтической роли нестероидных противовоспалительных средств с целью профилактики прогрессирования БА [26].

Немаловажную роль в прогрессировании нейродегенеративных заболеваний играет активация процессов оксидативного стресса, что приводит к увеличению концентрации NO, пероксинитрита ($ONOO^-$), продуктов перекисного окисления липидов и к нарушению функционирования Na^+/K^+ АТФ-азы [27]. У пациентов с БА выявлено значимое увеличение активности тромбоцитарной NO синтетазы по сравнению с здоровыми добровольцами [28]. В более поздней работе Vignini с соавт. в тромбоцитах пациентов с БА наблюдается значимое увеличение концентрации NO, повышение концентрации внутриклеточного кальция и снижение активности Na^+/K^+ АТФ-азы по сравнению с контрольной группой [29]. У носителей APOE $\epsilon 4$ определяется повышенный синтез оксида азота в тромбоцитах по сравнению с респондентами без данной аллели [30].

Изменение активности моноаминоксидазы-В (МАО-В). У пациентов с болезнью Альцгеймера выявлено повышение уровня МАО-В в тромбоцитах, однако данные изменения не являются специфичными, так как на концентрацию МАО-В влияет множество факторов, в том числе курение, алкоголь и особенности питания. МАО-В локализуется на наружной поверхности митохондрий и участвует в процессах разрушения дофамина и других вазоактивных моноаминов [16]. Точные механизмы повышения активности данного фермента у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями в настоящее время изучены недостаточно [31]. Рост концентрации МАО-В ассоциируется с увеличением возраста у исследуемых с нормальным когнитивным статусом, но изменение данного параметра не коррелирует с показателями MMSE [32, 33]. Однако в работе Muck-Seler с соавт. была выявлена статистически достоверная корреляция между показателями MMSE, возрастом, уровнем серотонина и моноаминоксидазой-В тромбоцитов у пациентов с болезнью Альцгеймера [34]. Таким образом, в различных исследованиях, посвященных изучению уровня МАО-В у пациентов с когнитивными нарушениями, получены противоречивые результаты, не позволяющие сделать однозначный вывод о прогностической ценности данного фермента в качестве предиктора развития нейродегенеративных процессов.

Изменение активности цитохром с-оксидазы (ЦсО). Помимо изменения концентрации ЦОГ-2 и МАО-В у пациентов с БА обнаружено снижение активности цитохром с-оксидазы на 15% процентов, однако причины данного процесса до конца не изучены [35]. В исследовании Parker с соавт. средняя активность цитохром с-оксидазы в группе пациентов с болезнью Альцгеймера составила 0.193 сек-1/мг, в контрольной группе 0.233 сек-1/мг [36]. В отечественной работе Бурбаевой с соавт. были подтверждены данные об уменьшении активности ЦсО у пациентов с УКН и БА (тест Краскела—Уоллиса $p = 0.0001$, $\chi^2 = 11.6$, $p = 0.003$). Авторы также выявили достоверное изменение количества подобного глутаминсинтетазе белка и его обратную корреляционную связь с показателями шкалы MMSE ($R = -0.43$, $p = 0.007$). Более высокая экспрессия данного белка ассоциировалась с более низкими показателями оценки когнитивного статуса [37].

Снижение активности цитохром с-оксидазы сопровождается уменьшением концентрации АТФ и активацией процессов оксидативного стресса, что приводит к снижению резистентности ткани и усилению эндотоксичности [32, 38]. Несмотря на наличие данных об уменьшении ЦсО при развитии болезни Альцгеймера, в работе Van Zuylen с соавт. достоверных различий в активности ЦсО у пациентов с БА и исследуемых с нормальным когнитивным статусом выявлено не было [39]. Опубликованы данные, демонстрирующие более низкую активность цитохром с-оксидазы тромбоцитов

у носителей АРОЕ $\epsilon 4$ по сравнению с неносителями, что может быть связано с ингибирующим влиянием продукта деградации АРОЕ $\epsilon 4$ -кодируемого аполипротеина Е на функцию ЦсО [40]. Таким образом, обосновано проведение крупных проспективных исследований для оценки значимости изменений активности цитохром с-оксидазы тромбоцитов у пациентов с УКН и БА с целью определения возможности использования данного фермента в качестве лабораторного маркера.

Изменения активности киназы гликоген синтетазы-3 β (ГСК-3 β). Обнаружено усиление функции киназы гликоген синтетазы-3 в тромбоцитах у пациентов с БА вследствие нарушения процессов ферментного ингибирования [[41]. У пациентов с БА, УКН и депрессией было обнаружено увеличение активности ГСК-3 β тромбоцитов, что может быть вызвано нарушением процессов фосфорилирования ГСК-3 β . В частности, в группе пациентов с БА и УКН наблюдалось значительное снижение концентрации Ser-9 фосфорилированной ГСК-3 β и соотношения Ser-9 фосфорилированной ГСК-3 β /общая ГСК-3 β ($p = 0.04$) [42, 43]. У пациентов с сахарным диабетом 2 типа и умеренными когнитивными нарушениями также выявлялось повышение показателей соотношения общей ГСК-3 β к Ser-9 фосфорилированной ГСК-3 β по сравнению с пациентами без УКН. Использование комбинации оптинейрина и соотношения общей ГСК-3 β к Ser-9 фосфорилированной ГСК-3 β тромбоцитов характеризовалось высокой диагностической точностью для выявления УКН у пациентов с сахарным диабетом 2 типа: AUC – 0.927, специфичность – 86.7%, чувствительность – 85.3%, точность – 0.859 [44]. Возможно, в основе увеличения активности ГСК-3 β лежит изменение функционирования основных путей (Akt/PKB, Wnt инсулиновые пути), через которые осуществляется фосфорилирование эпитопа серина-9, то есть непосредственная инактивация ГСК-3 β [45].

Изменение активности фосфолипаз. Получены данные, демонстрирующие изменение активности фосфолипазы A2 (ФЛ-A2) тромбоцитов у пациентов с когнитивными нарушениями [41]. Увеличение концентрации фосфолипазы A2 может быть вызвано активацией амилоидогенного метаболического пути в тромбоцитах у пациентов с болезнью Альцгеймера. В работе Gattaz с соавт. опубликованы данные оценки уровня различных форм фосфолипазы A2 в группе пациентов с УКН и БА в течение 4 лет. У пациентов с УКН и деменцией уровень внутриклеточной кальций-независимой ФЛ-A2 был ниже по сравнению с контрольной группой ($p = 0.001$). Более низкий уровень внутриклеточной кальций-независимой ФЛ-A2 характеризовался более высоким риском прогрессирования когнитивных нарушений ($p = 0.009$). При изучении уровня других подтипов ФЛ-A2 было установлено, что развитие умеренных когнитивных нарушений у респондентов с нормальным когнитивным статусом ассоциировано со снижением уровня цитозольной кальций-зависимой ФЛ-A2

($p = 0.014$) и секретируемой кальций-зависимой ФЛ-A2 ($p = 0.014$ и $p = 0.009$) [46]. Однако опубликованы и противоположные результаты, демонстрирующие, что у пациентов с УКН наблюдался более высокий уровень общей ФЛ-A2 в тромбоцитах ($p = 0.008$), а когнитивный тренинг приводил к снижению уровня активности данного фермента в группе УКН ($p = 0.019$), но не у здоровых добровольцев [47]. Повышение концентрации ФЛ-A2 у пациентов с болезнью Альцгеймера и васкулярной деменцией, но не у пациентов с нормальным когнитивным статусом описывалось и ранее [48].

В 2021 году было выявлено изменение концентрации общей ФЛ-A2 тромбоцитов у пациентов с УКН и БА. В группе пациентов с УКН увеличение концентрации ФЛ-A2 ассоциировалось с более низкими показателями MMSE, в то время как в группе пациентов с болезнью Альцгеймера более низкая концентрация ФЛ-A2 была связана с увеличением степени тяжести деменции по шкале CDR. Дискриминационный индекс (произведение показателей ФЛ-A2, оксидативного уровня и соотношения Cu/Zn) позволял с высокой точностью прогнозировать риск развития деменции и ее прогрессирование в группе пациентов с умеренными когнитивными нарушениями [49].

Таким образом, до конца не изучены основные механизмы изменения концентрации и функции фосфолипазы A2. Тем не менее, активация ФЛ-A2 способствует секреции A β PP, что может приводить к формированию “порочного круга”, так как A β PP в свою очередь способствует усилению активности ФЛ-A2. То есть существует взаимосвязь между амилоидогенным метаболизмом тромбоцитов и активностью ФЛ-A2. Более того, у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается снижение активности фосфолипазы C. Гомозиготные носители АроЕ с аллелью $\epsilon 3$ имеют более низкую концентрацию изоэстаза фосфолипазы C- $\delta 1$, чем носители АроЕ с аллелью $\epsilon 4$ [50].

Изменение активности серотонина (5-НТ). Серотонин не синтезируется в тромбоцитах, а захватывается в клетку через механизмы, схожие с серотонинергическими нейронами. Основным местом аккумуляции серотонина являются плотные гранулы, откуда после активации тромбоцитов он может высвобождаться и связываться с тромбоцитарными серотониновыми рецепторами 2А (5-НТ2А) и 3А (5-НТ3А). Связывание серотонина с данными рецепторами активирует фосфолипазу C β (ФЛС β), что приводит к внутриклеточному высвобождению Ca²⁺ и аутокринной регуляции экспрессии интегрин α IIb/ β 3 и Р-селектина [51]. У пациентов с БА наблюдается снижение числа тромбоцитарных плотных гранул, а, следовательно, и внутриклеточная концентрация серотонина [16]. Однако, опубликованы данные, свидетельствующие как о возможном повышении концентрации серотонина при БА вследствие изменения кинетических характеристик, так и об отсутствии достоверных различий в уровне 5-НТ у пациентов с бо-

лезнью Альцгеймера [52, 53]. Milovanovic с соавт. выявили значимое повышение концентрации серотонина в субпопуляции более активных тромбоцитов с низкой плотностью в группе БА ($p < 0.05$), что может быть связано с аккумуляцией 5-НТ в гранулах вследствие ингибирования его высвобождения [54]. Однако, Tajeddinn с соавт. обнаружили связь между снижением уровня серотонина и увеличением концентрации общего таубелка ($p = 0.026$) и показателя соотношения таубелок/Аβ42 ($p = 0.001$) в цереброспинальной жидкости у пациентов с субъективными когнитивными нарушениями [55]. Таким образом, прогностическая значимость оценки уровня серотонина в тромбоцитах у пациентов с БА продолжает изучаться.

Изменение концентрации липидов. В настоящее время существуют различные данные об изменении содержания липидов в мембране тромбоцитов. Сообщается о снижении соотношения холестерина и фосфолипидов у пациентов с БА (9.37 ± 1.11) по сравнению с контрольной группой (10.20 ± 1.04), $p < 0.01$ [56]. В исследовании Liu с соавт. были подтверждены ранее полученные данные о повышении уровня холестерина и ганглиозида GM1 в группе пациентов с БА, но не у пациентов с умеренными когнитивными нарушениями [57]. Повышение уровня холестерина может быть связано с нарушением гомеостаза и увеличением активности АβPP бета-секретазы, что, в свою очередь, способствует активации амилоидогенного метаболизма [58]. Также формированию нерастворимого бета-амилоида способствует связывание Аβ с GM1 ганглиозидом и образование комплексов GAB, которые служат субстратом дальнейшей агрегации Аβ [59]. Помимо изменения концентрации холестерина и ганглиозидов у пациентов с болезнью Альцгеймера может наблюдаться изменение количества фосфатидилхолинов, в частности диацил и ацил-алкил фосфатидилхолинов [60].

Несмотря на имеющиеся данные о возможной диагностической роли холестерина и липидов тромбоцитов в диагностике болезни Альцгеймера, отсутствие крупных исследований и оценки воспроизводимости имеющихся результатов не позволяет сделать однозначное заключение о возможной роли изменения данных показателей в лабораторной диагностике болезни Альцгеймера.

Изменение альфа-синуклеина, кластерина и иммуноглобулина G. Считается, что у пациентов с болезнью Паркинсона (БП) наблюдается гиперэкспрессия белка альфа-синуклеина на плазматической мембране, эндоплазматическом ретикулуме и в альфа-гранулах тромбоцитов. Получены данные о возможном влиянии гена, регулирующего синтез альфа-синуклеина (SNCA) на изменение функционирования и активность тромбоцитов [61]. В частности, у пациентов с болезнью Паркинсона наблюдался больший размер тромбоцитов по сравнению с контрольной группой и пациентами с БА ($p < 0.001$) [62]. Однако у мышей, нокаутных по гену SNCA (—/—), выявлено уменьшение размера

тромбоцитов с дополнительными признаками дегрануляции и фрагментации. Также у пациентов с болезнью Паркинсона наблюдалось нарушение функционирования дыхательной цепи митохондрий и, как следствие, уменьшение тромбоцитарной агрегации [63]. Несмотря на доказательства влияния SCNA гена на функцию тромбоцитов, механизмы взаимосвязи данных изменений с развитием и прогрессированием когнитивных нарушений при болезни Паркинсона остаются до конца не изученными. В пилотном исследовании 2012 г (Mukaetova-Ladinska с соавт.) концентрация альфа-синуклеина достоверно не различалась между пациентами с БА и контрольной группой, что может свидетельствовать о второстепенной роли данного белка в развитии и прогрессировании деменции альцгеймеровского типа. Однако ввиду небольшого размера выборки (группа БА — 25 человек, контрольная группа — 26) не исключается ошибка второго рода [64].

Кластерин — белок ингибитор комплемента — локализуется на поверхности клеток и участвует в фундаментальных процессах, таких как клеточная адгезия, апоптоз, транспорт липидов [16]. Кластерин способствует формированию агрегатов бета-амилоида и их транспортировке через гематоэнцефалический барьер, а также активации процессов оксидативного стресса, что может способствовать развитию клинических признаков деменции [65]. В более поздней работе Mukaetova-Ladinska с соавт. было выявлено, что уровень кластерина тромбоцитов не позволял достоверно дифференцировать пациентов с БА (48.46 ± 6.69 , 95% ДИ: 34.65–62.26) от здоровых респондентов (50.03 ± 45.33 , 95% ДИ: 31.72–68.35), $p = 0.910$. Однако, было обнаружено, что в группе пациентов с БА соотношение плазменного/тромбоцитарного кластерина коррелировало со следующими поведенческими симптомами: ажитация/агрессия ($r = 0.431$, $p = 0.032$), апатия ($r = 0.647$, $p < 0.0001$), раздражительность ($r = 0.502$, $p = 0.011$), дезингибция/расторможенность ($r = 0.457$, $p = 0.022$), абберантное моторное поведение ($r = 0.454$, $p = 0.023$) [66]. Таким образом, данное соотношение может иметь потенциальную прогностическую ценность для выявления высокого риска развития поведенческих нарушений у пациентов с болезнью Альцгеймера.

Считается, что увеличение концентрации IgG в альфа-гранулах тромбоцитов пропорционально увеличению IgG в плазме. Известно, что 99% IgG локализуется в альфа-гранулах и всего 1% на мембране. На сегодняшний день достоверная оценка изменения концентрации IgG проведена в еще одной работе Mukaetova-Ladinska с соавт. Авторы обнаружили, что у пациентов с БА наблюдается статистически значимое увеличение концентрации общего IgG в среднем на 16.5%: группа БА, IgG = 5.61 (95% ДИ 2.75–10.71), контрольная группа, IgG = 5.03 (95% ДИ 2.98–5.98), $p = 0.021$. Интересно, что содержание плазменного IgG в группах достоверно не различалось ($p = 0.428$). Таким образом, целесообразно проведение более круп-

ных когортных исследований для подтверждения гипотезы о прогностической ценности IgG тромбоцитов для диагностики БА [67].

Изменение протеома тромбоцитов. Для большего понимания потенциальной значимости белковых изменений в тромбоцитах, в 2021 г. было выполнено небольшое исследование, в котором оценивалась связь изменений различных белков с выраженностью когнитивных нарушений методом масс-спектрометрии у 28 человек. Дискриминантный анализ частичных наименьших квадратов выявил наиболее значимые изменения 9 белков, включая PNB, UQCRH, CD63, GP1BA, FINC, RAP1A, ITPR1/2 и ADAM10, на основании изменения которых с высокой точностью представлялось возможным выявлять пациентов с риском прогрессирования когнитивной дисфункции. Дальнейший анализ с помощью машинного обучения выявил, что комбинированное уменьшение уровня 4 белков PNB, UQCRH, GP1BA и FINC с наибольшей точностью позволяло прогнозировать ухудшение показателей когнитивных функций у пациентов с болезнью Альцгеймера. Более того, были обнаружены три KEGG пути, положительно коррелировавшие с показателями шкалы MMSE и еще два пути, характеризующиеся отрицательной корреляционной связью. Таким образом, полученные результаты могут использоваться для оценки воспроизводимости полученных данных на большей выборке в рамках комплексного сопоставления с другими параметрами [68].

Помимо протеомных изменений неспецифических белков у пациентов с болезнью Альцгеймера выявлено значимое повышение концентрации фосфорилированного белка TDP-43 (S409/410-2) до 60% не только в нейронах, но и в тромбоцитах ($p \leq 0.015$). Wilhite с соавт. предположили, что изменение концентрации данного белка может использоваться в качестве суррогатного биомаркера для лабораторной диагностики болезни Альцгеймера [69].

Изменения микроРНК. Известно, что процессы расщепления предшественника белка амилоида регулируются различными микроРНК. Например, функция бета-секретазы 1 регулируется следующими типами микроРНК: miR-9, miR-29a/b-1, miR-124, miR-195, miR-285, miR-298. Важное участие в процессах метаболизма белка предшественника амилоида принимают let-7i, miR-16, miR-20a, miR-101, miR-106a/b и miR-155, и другие типы микроРНК (miR-17, miR-147, miR-153, miR-323-3p, miR-644, miR-655). Таким образом, можно сделать вывод, что процессы формирования нерастворимого бета-амилоида носят многоступенчатый и комплексный характер, ассоциированы не только с прямым и непрямым регулятивным влиянием микроРНК, но и с влиянием альтернативного сплайсинга [70]. Детерминация регуляторных процессов, контролируемых микроРНК, позволяет рассматривать данные молекулы в качестве диагностического материала, так как

изменение активности различных подтипов микроРНК может позволить верифицировать этиологию нейродегенеративного процесса на начальной стадии.

В исследовании Gámez-Valero с соавт. изучалась диагностическая роль различных типов тромбоцитарной микроРНК с целью дифференциальной диагностики болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и деменции с тельцами Леви (ДТЛ) у 162 пациентов в течение 2 лет. Было выявлено, что биосигнатуры 7 микроРНК (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-132-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-26b-5p) позволяют с высокой точностью дифференцировать пациентов с болезнью Альцгеймера и пациентов с деменцией с тельцами Леви: чувствительность и специфичность — 100%, AUC = 1, $p < 0.01$. У пациентов с ДТЛ наблюдается даунрегуляция всех 7 типов данных микроРНК по сравнению с БА. При сравнении транскриптома пациентов с БП и ДТ на основании изменения двух микроРНК (hsa-miR-150-5p, hsa-miR-26b-5p) были получены следующие результаты: AUC = 0.83 (95% ДИ 0.73–0.98; 90% чувствительность и 73.7% специфичность), что также является хорошей прогностической моделью. Более того, изменение сигнатур различных микроРНК позволяло с высокой точностью дифференцировать здоровых добровольцев от пациентов с болезнью Альцгеймера (AUC = 0.94), болезнью Паркинсона (AUC = 0.81), деменцией с тельцами Леви (AUC = 0.85). Интересным представляется факт отсутствия достоверных различий регуляции микроРНК в цельной крови у пациентов с БА, БП и ДТЛ. Также было установлено, что при различных заболеваниях задействованы разные механизмы дерегуляции: при ДТЛ — экспрессия генов и уменьшение метаболизма, при БА — стрессовый ответ, при БП — фосфорилирование белков, метаболизм и деградация [71].

В 2020 г. предложен метод диагностики БА на основании изменения соотношений регуляции и баланса подтипов микроРНК-150 в тромбоцитах. Метод тройного сравнения предшественника микроРНК-150 и “зрелых” форм (микроРНК-150 3p и микроРНК-150 5p) позволяет с высокой точностью выявлять пациентов с БА, и использование данного типа микроРНК может играть важную роль в разработке диагностических панелей БА и является потенциальной мишенью для таргетной терапии [72].

В другом исследовании было выявлено, что уменьшение концентрации miR-1233-5p тромбоцитов ассоциировано с Аβ-опосредованным усилением экспрессии Р-селектина и повышением степени клеточной адгезии к фибронектину. Авторы предположили, что именно данный подтип микроРНК может являться потенциальным маркером ранней стадии болезни Альцгеймера [73].

Таким образом, изучение прогностической роли микроРНК может играть важную роль в разработке потенциальных диагностических тестов для вы-

явления и дифференциальной диагностики различных типов деменций и, вероятно, обладает не меньшей точностью по сравнению с плазменными показателями. Более того, исследование микроРНК может использоваться в качестве верифицирующего маркера в дополнение к бета-амилоиду, тау-белку и компонентам амилоидогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сходство биохимических и патофизиологических процессов в тромбоцитах и в нейронах позволило сформулировать гипотезу, что тромбоциты являются своеобразным “зеркалом” нервных клеток и представляют интерес в качестве перспективных периферических субстратов для ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний на основании изменения определенных патохимических и патофизиологических реакций.

Несмотря на большое количество данных об изменении различных параметров тромбоцитов и их взаимосвязи с когнитивными нарушениями, необходимо учитывать гетерогенность публикаций. Одномоментный дизайн подавляющего большинства работ не позволяет верифицировать причинно-следственные связи, а полученные результаты нередко носят противоречивый характер и подвержены влиянию конфаундеров. Тем не менее, выделены наиболее перспективные тромбоцитарные маркеры: тау-белок, ADAM10, BACE1 и AβPP (+ фракция “укутанных” тромбоцитов) [16]. В систематическом обзоре подтверждена предиктивная ценность белка предшественника амилоида, однако окончательная чувствительность и специфичность данного показателя остается до конца не изученной. Также возможным прогностическим маркером может являться цитохром с-оксидаза [74].

Наряду с новыми данными о спектре протеомных альтераций и особенностей регуляции различных подтипов микроРНК, комплексная оценка данных показателей с учетом структурно-функциональных изменений позволит выявить взаимосвязь, на основании которой станет возможно создание потенциальных диагностических моделей не только для первичной верификации этиологии когнитивных нарушений, но и для проведения дифференциальной диагностики. Более того, обнаружение определенных патологических сдвигов в тромбоцитах позволяет использовать экспериментальную таргетную терапию для воздействия на эти же процессы в нейронах с целью предотвращения прогрессирования заболеваний. Однако отсутствие точных данных о причинно-следственной связи между изменениями тромбоцитов и нейродегенеративными процессами затрудняет разработку и имплементацию новых методов лечения. Необходимо проведение крупных когортных исследований с комплексной оценкой известных тромбоцитарных биомаркеров для определения закономерностей механизмов развития па-

тологических реакций, что, в свою очередь, необходимо для определения чувствительности и специфичности комбинации данных показателей, а также для определения потенциальных точек приложения таргетной терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Holinstat M.* // Cancer Metastasis Rev. 2017. V. 36. № 2. P. 195–198.
2. *Canobbio I.* // Res. Pract. Thromb. Haemost. 2019. V. 3. № 4. P. 564–565.
3. *Baethge C., Goldbeck-Wood S., Mertens S.* // Res. Integr. Peer Rev. 2019. V. 4. P. 5.
4. *Wassmer S.C., Humpel C., Orian J.M.* // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 772352.
5. *Carbone M.G., Pagni G., Tagliarini C., Imbimbo B.P., Pomara N.* // Ageing Res. Rev. 2021. V. 71. P. 101420.
6. *Kopeikina E., Ponomarev E.D.* // Front. Cell. Neurosci. 2021. V. 15. P. 680126.
7. *Leiter O., Walker T.L.* // Prog. Neurobiol. 2019. V. 183. P. 101695.
8. *Leiter O., Walker T.L.* // Front. Immunol. 2020. V. 11. P. 747.
9. *Eratne D., Loi S.M., Farrand S., Kelso W., Velakoulis D., Looi J.C.* // Australas Psychiatry. 2018. V. 26. № 4. P. 347–357.
10. *Donner L., Fälker K., Gremer L., Klinker S., Pagani G., Ljungberg L.U., Lothmann K., Rizzi F., Schaller M., Gohlke H., Willbold D., Grenegard M., Elvers M.* // Sci. Signal. 2016. V. 9. № 429. P. ra52.
11. *Giau V.V., Bagyinszky E., Youn Y.C., An S.S.A., Kim S.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 19. P. E4757.
12. *Bram J.M. de F., Talib L.L., Joaquim H.P.G., Sarno T.A., Gattaz W.F., Forlenza O.V.* // Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2019. V. 269. № 8. P. 963–972.
13. *Vatanabe I.P., Pedrosa R.V., Manzine P.R., Chagas M.H.N., de Moraes Fabrício D., Grigoli M.M., Naves M.A., Pott-Jr H., Cominetti M.R.* // Exp. Gerontol. 2021. V. 149. P. 111303.
14. *Hampel H., Vassar R., De Strooper B., Hardy J., Willem M., Singh N., Zhou J., Yan R., Vanmechelen E., De Vos A., Nisticò R., Corbo M., Imbimbo B.P., Streffer J., Voytyuk I., Timmers M., Tahami Monfared A.A., Irizarry M., Alcala B., Koyama A., Watanabe N., Kimura T., Yarenis L., Lista S., Kramer L.* // Biol. Psychiatry. 2021. V. 89. № 8. P. 745–756.
15. *Sarno T.A., Talib L.L., Joaquim H.P., Bram J.M., Gattaz W.F., Forlenza O.V.* // J. Alzheimer's Dis. 2017. V. 55. № 4. P. 1445–1451.

16. Akingbade O.E.S., Gibson C., Kalaria R.N., Mukaetova-Ladinska E.B. // J. Alzheimer's Dis. 2018. V. 63. № 4. P. 1235–1259.
17. Prodan C.I., Ross E.D., Stoner J.A., Cowan L.D., Vincent A.S., Dale G.L. // Neurology. 2011. V. 76. № 3. P. 247–252.
18. Aliotta A., Bertaggia Calderara D., Zermatten M.G., Alberio L. // Thromb. Haemost. 2021. V. 121. № 3. P. 309–321.
19. Prodan C.I., Szasz R., Vincent A.S., Ross E.D., Dale G.L. // Platelets. 2006. V. 17. № 1. P. 56–60.
20. Shi Y., Gu L., Wang Q., Gao L., Zhu J., Lu X., Zhou F., Zhu D., Zhang H., Xie C., Zhang Z. // J. Gerontol. Series A. Biol. Sci. Med. Sci. 2020. V. 75. № 4. P. 664–670.
21. Carbone M.G., Pagni G., Tagliarini C., Marazziti D., Pomara N. // Life (Basel). 2021. V. 11. № 8. P. 750.
22. Guzmán-Martínez L., Tapia J.P., Fariás G.A., González A., Estrella M., Maccioni R.B. // J. Alzheimer's Dis. 2019. V. 67. № 4. P. 1181–1186.
23. Slachevsky A., Guzmán-Martínez L., Delgado C., Reyes P., Fariás G.A., Muñoz-Neira C., Bravo E., Fariás M., Flores P., Garrido C., Becker J.T., López O.L., Maccioni R.B. // J. Alzheimer's Dis. 2017. V. 55. № 4. P. 1595–1603.
24. Pluta R., Ułamek-Kozioł M. // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1118. P. 71–82.
25. Bermejo P., Martín-Aragón S., Benedí J., Susín C., Felici E., Gil P., Ribera J.M., Villar A.M. // Immunol Lett. 2008. V. 117. № 2. P. 198–202.
26. Szekely C.A., Zandi P.P. // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2010. V. 9. № 2. P. 132–139.
27. Wojsiat J., Laskowska-Kaszub K., Mielenska-Porowska A., Wojda U. // Biomark. Med. 2017. V. 11. № 10. P. 917–931.
28. Kawamoto E.M., Munhoz C.D., Glezer I., Bahia V.S., Caramelli P., Nitrini R., Górgão R., Curi R., Scavone C., Marcourakis T. // Neurobiol. Aging. 2005. V. 26. № 6. P. 857–864.
29. Vignini A., Giusti L., Raffaelli F., Giulietti A., Salvolini E., Luzzi S., Provinciali L., Mazzanti L., Nanetti L. // Exp. Gerontol. 2013. V. 48. № 3. P. 319–325.
30. Marcourakis T., Bahia V.S., Kawamoto E.M., Munhoz C.D., Górgão R., Artes R., Kok F., Caramelli P., Nitrini R., Curi R., Scavone C. // Cell. Biochem. Funct. 2008. V. 26. № 8. P. 852–858.
31. Canobbio I., Abubaker A.A., Visconte C., Torti M., Pula G. // Front. Cell. Neurosci. 2015. V. 9. P. 65.
32. Veitinger M., Varga B., Guterres S.B., Zellner M. // Acta Neuropathol. Commun. 2019. V. 2. P. 65.
33. Zellner M., Baureder M., Rappold E., Bugert P., Kotzailias N., Babeluk R., Baumgartner R., Attems J., Gerner C., Jellinger K., Roth E., Oehler R., Umlauf E. // J. Proteomics. 2012. V. 75. № 7. P. 2080–2092.
34. Muck-Seler D., Presecki P., Mimica N., Mustapic M., Pivac N., Babic A., Nedec G., Folnegovic-Smalc V. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2009. V. 33. № 7. P. 1226–1231.
35. Cardoso S.M., Proença M.T., Santos S., Santana I., Oliveira C.R. // Neurobiol. Aging. 2004. V. 25. № 1. P. 105–110.
36. Parker W.D., Mahr N.J., Filley C.M., Parks J.K., Hughes D., Young D.A., Cullum C.M. // Neurology. 1994. V. 44. № 6. P. 1086–1090.
37. Burbaeva G.S., Boksha I.S., Savushkina O.K., Turishcheva M.S., Tereshkina E.B., Starodubtseva L.I., Gavri-lova S.I., Fedorova I.A., Zhuravin I.A. // Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova. 2012. V. 112. № 2. P. 55–58.
38. Bosetti F., Brizzi F., Barogi S., Mancuso M., Siciliano G., Tendi E.A., Murri L., Rapoport S.I., Solaini G. // Neurobiol. Aging. 2002. V. 23. № 3. P. 371–376.
39. Van Zuylen A.J., Bosman G.J., Ruitenbeek W., Van Kalmthout P.J., De Grip W.J. // Neurology. 1992. V. 42. № 6. P. 1246–1247.
40. Wilkins H.M., Koppel S.J., Bothwell R., Mahnken J., Burns J.M., Swerdlow R.H. // Redox Biol. 2017. V. 12. P. 828–832.
41. Omar S.H., Predy J. // J. Pers. Med. 2020. V. 10. № 3. P. E63.
42. Forlenza O.V., Torres C.A., Talib L.L., de Paula V.J., Joaquim H.P., Diniz B.S., Gattaz W.F. // J. Psychiatr. Res. 2011. V. 45. № 2. P. 220–224.
43. Pláteník J., Fišar Z., Buchal R., Jiráček R., Kitzlerová E., Zvěřová M., Raboch J. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2014. V. 50. P. 83–93.
44. Yu H., Liu Y., He T., Zhang Y., He J., Li M., Jiang B., Gao Y., Chen C., Ke D., Liu J., He B., Yang X., Wang J.Z. // Aging Cell. 2021. V. 20. № 10. P. e13469.
45. Beurel E., Grieco S.F., Jope R.S. // Pharmacol. Ther. 2015. V. 148. P. 114–131.
46. Gattaz W.F., Talib L.L., Schaeffer E.L., Diniz B.S., Forlenza O.V. // J. Neural. Transm. (Vienna). 2014. V. 121. № 2. P. 193–200.
47. Ballelli M., Giuli C., Fattoretti P., Fabbietti P., Postacchini D., Conti F. // J. Alzheimer's Dis. 2016. V. 50. № 4. P. 957–962.
48. Krzystanek E., Krzystanek M., Opala G., Trzeciak H.I., Siuda J., Małeck A. // J. Neural. Transm. (Vienna). 2007. V. 114. № 8. P. 1033–1039.
49. Ballelli M., Casoli T., Giacconi R., Giuli C. // Rejuvenation Res. 2022. V. 25. № 1. P. 16–24.
50. Catricala S., Torti M., Ricevuti G. // Immun. Ageing. 2012. V. 9. № 1. P. 20.
51. Izzj B., Tirozzi A., Cerletti C., Donati M.B., de Gaetano G., Hoylaerts M.F., Iacoviello L., Gialluisi A. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 22. P. E8817.
52. Kumar A.M., Kumar M., Sevush S., Ruiz J., Eisdorfer C. // Psychiatry Res. 1995. V. 59. № 1–2. P. 145–150.
53. Tukiainen E., Wikström J., Kilpeläinen H. // Med. Biol. 1981. V. 59. № 2. P. 116–120.
54. Milovanovic M., Eriksson K., Winblad B., Nilsson S., Lindahl T.L., Post C., Järemo P. // Clin. Biochem. 2014. V. 47. № 15. P. 51–53.
55. Tajeddinn W., Fereshtehnejad S.M., Seed Ahmed M., Yoshitake T., Kehr J., Shahnaz T., Milovanovic M., Behbahani H., Höglund K., Winblad B., Cedazo-Minguez A., Jelic V., Järemo P., Aarsland D. // J. Alzheimer's Dis. 2016. V. 53. № 2. P. 621–630.
56. Cohen B.M., Zubenko G.S., Babb S.M. // Life Sci. 1987. V. 40. № 25. P. 2445–2451.
57. Liu L., Zhang K., Tan L., Chen Y.H., Cao Y.P. // Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 2015. V. 29. № 1. P. 63–69.
58. Shi C., Liu J., Wu F., Zhu X., Yew D.T., Xu J. // J. Bioenerg. Biomembr. 2011. V. 43. № 6. P. 691–697.
59. Hayashi H., Kimura N., Yamaguchi H., Hasegawa K., Yokoseki T., Shibata M., Yamamoto N., Michikawa M., Yoshikawa Y., Terao K., Matsuzaki K., Lemere C.A., Selkoe D.J., Naiki H., Yanagisawa K. // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 20. P. 4894–4902.

60. Foidl B.M., Oberacher H., Marksteiner J., Humpel C. // *Front. Neurol.* 2020. V. 11. P. 359.
61. Ferrer-Raventós P., Beyer K. // *Neurobiol. Dis.* 2021. V. 159. P. 105512.
62. Koçer A., Yaman A., Niftaliyev E., Dürüyen H., Eryılmaz M., Koçer E. // *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 2013. V. 2013. P. 986254.
63. Pei Y., Maitta R.W. // *Heliyon.* 2019. V. 5. № 10. P. e02590.
64. Mukaetova-Ladinska E.B., Abdel-All Z., Dodds S., Andrade J., Alves da Silva J., Kalaria R.N., O'Brien J.T. // *Age Ageing.* 2012. V. 41. № 3. P. 408–412.
65. Thambisetty M., Simmons A., Velayudhan L., Hye A., Campbell J., Zhang Y., Wahlund L.O., Westman E., Kinsey A., Güntert A., Proitsi P., Powell J., Causevic M., Killick R., Lunnon K., Lynham S., Broadstock M., Choudhry F., Howlett D.R., Williams R.J., Sharp S.I., Mitchemore C., Tunnard C., Leung R., Foy C., O'Brien D., Breen G., Furney S.J., Ward M., Kloszewska I., Mecocci P., Soininen H., Tsolaki M., Vellas B., Hodges A., Murphy D.G., Parkins S., Richardson J.C., Resnick S.M., Ferrucci L., Wong D.F., Zhou Y., Muehlboeck S., Evans A., Francis P.T., Spenger C., Lovestone S. // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2010. V. 67. № 7. P. 739–748.
66. Mukaetova-Ladinska E.B., Abdel-All Z., Andrade J., Alves da Silva J., O'Brien J.T., Kalaria R.N. // *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2015. V. 30. № 4. P. 368–375.
67. Mukaetova-Ladinska E.B., Abdel-All Z., Andrade J., McNally R.J., James P.W., Kalaria R.N., O'Brien J.T. // *J. Alzheimer's Dis.* 2012. V. 32. № 2. P. 431–436.
68. Yu H., Liu Y., He B., He T., Chen C., He J., Yang X., Wang J.Z. // *Aging. Cell.* 2021. V. 20. № 5. P. e13358.
69. Wilhite R., Sage J.M., Bouzid A., Primavera T., Agbas A. // *Future Sci. OA.* 2017. V. 3. № 4. P. FSO238.
70. Espinosa-Parrilla Y., Gonzalez-Billault C., Fuentes E., Palomo I., Alarcón M. // *Front. Aging Neurosci.* 2019. V. 11. P. 151.
71. Gámez-Valero A., Campdelacreu J., Vilas D., Ispuerto L., Gascón-Bayarri J., Reñé R., Álvarez R., Armengol M.P., Borrás F.E., Beyer K. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 9. P. 1272.
72. Min J.-W., Lee J., Mun H.J., Kim D.H., Park B.G., Yoon B., Ryu J.H., Cho H.J. // *Genes Genomics.* 2020. V. 42. № 12. P. 1467–1475.
73. Lee B.K., Kim M.H., Lee S.Y., Son S.J., Hong C.H., Jung Y.S. // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. № 6. P. E1642.
74. Plagg B., Humpel C. // *The Non-Thrombotic Role of Platelets in Health and Disease* / ed. Kerrigan S.W., Moran N. InTech, 2015. P. 248.

Biochemical Platelet Markers of Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease

A. N. Kodintcev^{a, b, c}, N. V. Izmozherova^{a, b, c}, A. A. Popov^{a, b, c},
L. I. Volkova^c, I. P. Antropova^{a, b, c}, and A. V. Ryabinina^{a, b}

^aThe Institute of High Temperature Electrochemistry of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

^bThe Polyclinic of the Institute of High Temperature Electrochemistry
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

^cFederal State Budget Educational Institution of Higher Education "Ural State Medical University"
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russia

There is an increase in the prevalence of different cognitive disorders, including Alzheimer's disease (AD), which determines the relevance of searching for methods of early diagnosis of neurodegenerative diseases. Therefore, an active search for various peripheral biomarkers goes on, and the assessment of these biomarkers has to be carried out by a standardized and available methods in real clinical practice. Due to development of hypothesis about the similarity of biochemical and physiological processes in platelets and neurons, more and more attention is paid to investigation of possibility of using different structural and functional platelet parameters as biomarkers for different neurological diseases. In the current review, there is a description of the main platelet characteristics and their changes at the cognitive impairment: peripheral aspects of amyloidogenesis and tau protein formation, synthesis and metabolic shifts of active substances, microRNA deregulation, as well as dysfunction of enzymes and proteins that can be used to develop diagnostic tests for early detection of AD.

Keywords: biomarkers, platelets, cognitive impairment, Alzheimer's disease

РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ

© 2023 г. Г. В. Рукавишников¹ *, Т. В. Жилиева^{1, 2}, Е. Е. Дубинина¹, Г. Э. Мазо¹

¹ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева” Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ ВО “Приволжский исследовательский медицинский университет” Минздрава РФ, Нижний Новгород, Россия

Поступила в редакцию 16.04.2022 г.

После доработки 28.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Предполагается, что шизофрения может включать крайне гетерогенную группу фенотипов с различными биологическими и, в частности, нейрохимическими механизмами развития. Большое внимание при этом в вопросах развития шизофрении уделяется потенциальной роли иммунной системы и в особенности участию в данных процессах различных цитокинов. Интерлейкин-6 (IL-6) является одним из ключевых регуляторов воспалительных процессов, и ранее ряд исследований сообщал об изменениях его показателей при шизофрении. Однако данные о закономерностях этих изменений в литературе освещены значительно хуже и порой даже противоречат друг другу. Дихотомическое функционирование IL-6 может играть ключевую роль в регуляции как про-, так и противовоспалительных процессов. В связи с этим, роль данного цитокина в этиопатогенезе шизофрении может зависеть от фазы заболевания и контекста воспалительного процесса. Целью данного обзора было подробно проанализировать роль IL-6 в механизмах развития шизофрении и его потенциальное влияние на течение, диагностику и терапию данного заболевания.

Ключевые слова: провоспалительные цитокины, IL-6, шизофрения, этиопатогенез, нейровоспаление

DOI: 10.31857/S1027813323010168, **EDN:** ERAKSD

ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения — хроническое психическое заболевание, характеризующееся прогрессивным течением, высоким уровнем инвалидизации, снижением продолжительности жизни и повышением уровня смертности [1]. Для данного расстройства характерны как периоды обострения с продуктивной психотической (галлюцинаторной, бредовой) симптоматикой, так и постепенное нарастание с течением времени негативных симптомов (снижение в эмоциональной, волевой сферах) и нарушений когнитивных функций [1].

Несмотря на растущее число новых данных, этиопатогенез шизофрении до сих пор остается во многом неясным. Предполагается, что данное заболевание может включать крайне гетерогенную группу фенотипов с различными биологическими и, в частности, нейрохимическими механизмами развития [2, 3]. Большое внимание при этом в вопросах развития шизофрении уделяется потенциальной роли иммунной системы [4] и в особенности участию в данных процессах различных цитокинов [5–10]. Последние выступают свое-

го рода “гормонами” иммунного ответа и способны передавать сигналы и координировать функцию самых разнообразных клеток организма [5–10]. Интерлейкин-6 (IL-6) является одним из ключевых регуляторов воспалительных процессов, и ранее ряд исследований сообщал об изменениях его показателей при шизофрении [5–10]. Однако данные о закономерностях этих изменений в литературе освещены значительно хуже и порой даже противоречат друг другу.

В связи с этим целью данного обзора было подробно проанализировать роль IL-6 в механизмах развития шизофрении и его потенциальное влияние на течение, диагностику и терапию данного заболевания.

IL-6 – ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Любая передача сигналов в ответ на изменения со стороны внешней и внутренней сред организма сопряжена с активизацией механизмов адаптации, включающих иммунологическую, окислительно-восстановительную и гормональную системы, тесно связанные между собой. Наблюдается перестройка метаболического фона организма, сопровождающаяся интенсивным устранением по-

* Адресат для корреспонденции: 192019 Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 3; e-mail: grigory_v_r@mail.ru.

врежденных молекул, быстрым обновлением химического состава клеток, поддержанием их редокс-баланса. Основные компоненты этих систем обеспечивают поэтапную трансформацию сигнала в клетку за счет первичных и вторичных мессенджеров. Роль первичных мессенджеров выполняют цитокины, гормоны, факторы роста, нейротрансмиттеры, нейротрофины, взаимодействие которых со специфическими рецепторами сопряжено с образованием большой группы вторичных мессенджеров. Последние оказывают влияние на ключевые звенья метаболических процессов в клетке на уровне третичного звена передачи сигнала. Вся эта поэтапная передача сигнала обеспечивает определенный физиологический ответ, отражающий функциональную активность клетки, поддержание ее жизнедеятельности [11–13].

IL-6 в этой цепочке передачи информации выступает в качестве первичного мессенджера, осуществляя не только защиту организма от инфекции, но и участвуя в функциональной активности клеток. IL-6 секретируется различными типами клеток на различных стадиях иммунного ответа [7]. Так, в период острого воспаления IL-6 преимущественно секретируется моноцитами и макрофагами, а при хроническом воспалении — Т-клетками. В гомеостатических условиях уровень IL-6 в сыворотке невелик, но он быстро повышается при стрессовых влияниях. Данный цитокин модулирует крайне вариабельные аспекты работы иммунной системы: от гемопоэза и миграции нейтрофилов до регуляции синтеза С-реактивного белка, сывороточного амилоида А, фибриногена и других соединений [7].

Отдельный интерес представляет то, что IL-6 обладает как про-, так и противовоспалительными функциями в зависимости от контекста. Так, IL-6 играет решающую роль в дифференцировке олигодендроцитов, регенерации периферических нервов, действуя как нейротрофический фактор [14]. Однако следует отметить, что IL-6 в определенных условиях может являться триггером возникновения и прогрессирования ряда патологических состояний, таких как ревматоидный артрит, депрессивные расстройства, опухолевые поражения кишечника, воспалительные процессы легких и т.д. [15–18]. Несмотря на активное участие в развитии острого воспалительного ответа, в длительном периоде данный цитокин обладает регенеративными и иммуносупрессивными свойствами, направленными на разрешение воспаления [7]. В частности, IL-6 ингибирует активность транскрипционного фактора В-лимфоцитов и экспрессию хемокинового рецептора дендритных клеток [19]. В отношении дифференцировки Т-клеток IL-6 также может передавать сигналы как для индукции аутоиммунного ответа, так и его ингибирования и ограничения [20]. При этом как чрезмерная продукция, так и недостаточность секреции IL-6

может привести к дисрегуляции соотношения Th17 и Treg клеток, которая зачастую определяет при нарушениях иммунологической толерантности и при развитии аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний [21].

Такое разнонаправленное действие IL-6 связано с особенностями его взаимодействия со своим рецептором. Существуют два пути действия IL-6: классическая передача сигнала и альтернативная, так называемая транс-сигнализация.

1. Классический путь.

В процессе передачи сигналов активную роль приобретают процессы фосфорилирования/дефосфорилирования, которые катализируются ферментами протеинкиназами/фосфатазами. Цитокиновый рецептор IL-6R не обладает в отличие от других рецепторов ферментативной активностью, поэтому участвующие в передаче сигнала трансдукторы и аппликаторы приближены к нему. При взаимодействии IL-6 с рецептором фосфорилирование осуществляется за счет JAKs (Janus kinases).

При классическом сигнальном каскаде связывание IL-6 с мембраносвязанным альфа-рецептором IL-6R на поверхности клетки приводит к образованию активного комплекса IL-6/IL-6R. Этот активный комплекс вызывает на поверхности клеточной мембраны димеризацию его β -рецептора, содержащего трансдукционную субъединицу гликопротеина G-130, что приводит к активации тирозиновых протеинкиназ семейства JAK с последующей передачей сигналов на семейство белков STAT (Signal transducer and activator of transcription). Фосфорилирование при участии JAK отдельных членов семейства STAT приводит к их высвобождению из образовавшегося комплекса с G-300 с последующей димеризацией и поступлением в ядро. Фосфорилированная форма STAT выступает в ядре в качестве фактора транскрипции.

Фосфорилирование JAK–STAT также связано с функционированием MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulating kinase) и PI3K (phosphoinositide-3-kinase) — систем, контролирующих пролиферацию и дифференцировку клеток. В этом процессе передачи сигналов участвует так называемый Grb2 (adaptor protein), который имеет домен SH2. Последний, подвергаясь фосфорилированию за счет активированной JAKs, в свою очередь через активацию GTFазы запускает MAPK/ERK и PI3K системы, которые регулируют процессы пролиферации, апоптоза, дифференцировки клеток.

Все это определяет разностороннее действие IL-6 помимо его основного противовоспалительного влияния. Именно этим объясняется действие IL-6 в качестве нейротрофического фактора, участие в дифференцировке олигодендроцитов, регенерации периферических нервов и проявление нейропротекторного действия после травмы [14, 22, 23].

Таким образом, передача сигнала при участии IL-6 индуцируется за счет связывания образующего комплекса IL-6/IL-6R с его β -рецептором G-130, чтобы предотвратить неспецифическую активацию ряда процессов в клетке. Необходимым условием для реализации клеточного ответа за счет фосфорилирования JAK-STAT, MAPK/ERK и PI3K систем в ответ на поступление сигнала является присутствие G-130 на поверхности клеток [24].

2. Альтернативный путь.

Следует отметить, что рецептор IL-6R присутствует только в ограниченном типе клеток, таких как гепатоциты, лейкоциты и микроглия, но отсутствуют в олигодендрocyтах и астроцитах. Однако IL-6 присутствует в других типах клеток, в том числе и нейронах и астроцитах, участвует в передаче сигнала в ЦНС. Это обусловлено существованием помимо классического сигнального пути еще и альтернативного, или так называемого “транс-сигналинга”. В альтернативном пути функционирует растворимая форма белка sIL-6R, которая может образовываться путем альтернативного сплайсинга, либо протеолиза за счет действия металлопротеаз (ADAM). Образующийся комплекс sIL-6R/IL-6 вызывает гомодимеризацию субъединиц G130 в клетках, без участия мембранного IL-6R, что значительно расширяет спектр действия цитокина [14, 15].

Следует отметить, что передача сигнала через альтернативный путь отличается своей кинетикой от классического, что часто приводит к принципиально разным клеточным ответам. Если классическая передача сигналов имеет решающее значение в проявлении противовоспалительного действия, то альтернативный путь связан с провоспалительным ответом. Именно с транс-сигнализацией (“транс-сигналинг”) связаны IL-6-опосредованная нейродегенерация, опухолевые заболевания, артрит [14, 25–27].

Подобная функциональная дихотомия дает основания предполагать, что IL-6 регулирует баланс между про- и противовоспалительными ответами.

ВЛИЯНИЕ IL-6 НА ЦНС

Особую функцию выполняет IL-6 в головном мозге. Концентрация его поддерживается на довольно низком уровне, что при классическом пути передачи сигнала обеспечивает нормальное функционирование клеток. Именно классическая передача сигналов через IL-6 играет защитную роль в ЦНС, ускоряя регенерацию нервов, оказывает нейропротекторное действие [23, 28].

IL-6 также может продуцироваться активированными астроцитами и микроглиальными клетками головного мозга, а рецепторы к нему широко представлены в ЦНС [7–9]. IL-6 повышает секрецию центральных нейротрофинов различ-

ными клетками и на уровне нервной системы влияет на целый ряд функций организма: регулирует болевую чувствительность, эмоциональную, когнитивные сферы, болевой ответ, работу ГГН-оси и многие другие [7–9]. В отношении нейротрансмиссии IL-6 влияет на интенсивность дофаминергической и серотонинергической передач в гиппокампе и фронтальной коре, а также активирует кинурениновый путь, связанный с глутаматергической передачей [29]. Одним из возможных механизмов ингибирования нейрогенеза IL-6 является его действие на IL-6 рецептор или общий передатчик сигнала гликопротеин gp130 зубчатой извилины, а также стимуляция ГГН-оси [6].

Несмотря на указанные выше противовоспалительные свойства, повышенная активность IL-6 является ключевым фактором в поддержании процессов аутоиммунного воспаления, как в животных моделях, так и при неврологических заболеваниях ЦНС [30]. При этом появляется все больше сведений об изменениях показателей сыровороточного IL-6 при психических расстройствах, включая такие распространенные заболевания как расстройства настроения и шизофрения [31]. Колебания уровня цитокина в ту или иную сторону от нормативных показателей сопровождается развитием определенной патологии. Так, его снижение или отсутствие приводит к снижению активности глии при черепно-мозговой травме, изменениям поведения во время сна [14, 32, 33].

Резкое увеличение экспрессии и секреции IL-6 наблюдается при различных патологических состояниях нервной ткани, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона, опухолевые заболевания мозга, ишемия головного мозга, рассеянный склероз. Таким образом, если классическая передача сигналов связана с регенеративной функцией мозга, то при патологии включается альтернативный путь передачи сигнала IL-6, что сопряжено с дегенерацией нейронов. Соответственно возникает вопрос, с чем связано независимо от причины заболевания переключение метаболизма IL-6 с классической передачи сигналов на альтернативный. Известно, что при любой патологии наблюдается нарушение окислительно-восстановительного статуса организма, что сопряжено с развитием окислительного стресса, сопровождающегося интенсивной генерацией токсических свободно-радикальных продуктов. Именно активные формы кислорода являются причиной окислительной деструкции белков, липидов, углеводов, что отражается на функциональной активности рецепторов, ферментативных систем и т.д. Так как функционирование классического пути осуществляется только на поверхности клеточной мембраны, возможно, нарушение липидно-белковой структуры рецептора является одной из причин переключения передачи сигнала IL-6 на альтернативный путь.

Таким образом, анализ механизмов передачи сигналов с участием IL-6 с позиций их защитной и патогенной роли позволят с новых позиций оценить патогенетическую роль альтернативного пути у больных с психоневрологическими нарушениями и разработать новые подходы не только к соответствующей антицитокиновой, но и антиоксидантной терапии.

IL-6 ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

В настоящее время роль IL-6 активно изучается в отношении различных аспектов шизофрении: риска ее возникновения, особенностей течения и клинической картины, ответа на терапию и коморбидных состояний. Исследования охватывают все актуальные уровни, так работы в области генетики сообщают о том, что полиморфизм IL-6-174G/C ассоциирован с повышением IL-6 и риска развития шизофрении, а высокая экспрессия гена IL-6 при первом психотическом эпизоде негативно коррелирует с геном нейротрофического фактора BDNF и объемом гиппокампа [7, 9]. Подтверждено, что IL-6 входит в молекулярные пути, ассоциированные с повышенным риском и психических расстройств, и соматических заболеваний [7].

Взаимосвязь с течением заболевания. Метаанализ уровней провоспалительных цитокинов у пациентов с шизофренией показал у них повышения уровней IL-6 [5], однако в другом метаанализе указывается, что IL-6 повышается преимущественно при первом эпизоде психоза и остром рецидиве, в связи с чем может рассматриваться как маркер обострения заболевания [4]. Это было подтверждено повышенным уровнем IL-6 у субъектов с высоким риском психоза с предположением, что уровень цитокина можно использовать в качестве маркера в продромальном периоде [34]. В то же время другие результаты [35] не подтвердили повышение уровня IL-6 ни при первом эпизоде психоза, ни при рецидиве психотических симптомов шизофрении.

В обширном метаанализе, опубликованном в 2011 г. Miller и соавт. исследовали функцию цитокинов по фазам заболевания при шизофрении. Оценив 40 исследований, было обнаружено, что уровни IL-1 β , IL-6 и TGF- β повышались в острой фазе заболевания (как у пациентов с рецидивом, так и при первом эпизоде психоза) и снижались при успешном лечении [4]. IL-6 коррелировал с общим уровнем психопатологии в двух из пяти исследований [4]. Уровни TNF- α и IL-6 анализировались в большинстве исследований (всего 97 и 156 исследований соответственно). Было высказано предположение, что эти цитокины могут быть зависимыми от состояния маркерами воспаления, исчезающими с уменьшением симптомов. В то же время имеются и отдельные работы по повышению уровня IL-6 при хронической шизофрении [36].

При этом большинство исследователей склоняются к тому, что адекватная оценка показателей IL-6 у пациентов с шизофренией возможна только в контексте проводимой терапии.

Взаимосвязь с терапевтическим процессом. В систематический обзор и метаанализ [37] было включено 14 исследований, в которых оценивали уровни 20 различных цитокинов и цитокиновых рецепторов у 570 пациентов, ранее не принимавших антипсихотики. У большинства этих пациентов были диагностированы шизофрения или шизофреноформное расстройство (81% случаев). Для IL-1 β , IL-6, sIL2r и TNF α наблюдались очень значительные эффекты, что позволяет предположить, что увеличение этих цитокинов у пациентов с первым психотическим эпизодом (ППЭ) по сравнению с контрольной группой не связано с антипсихотическими препаратами. Эти цитокины играют ключевую роль в организации врожденного иммунного ответа: IL-1 β и TNF- α ответственны за стимуляцию продукции IL-6, в то время как IL-6 сигнализирует гепатоцитам о выработке белков острой фазы, таких как СРБ [37].

При этом в отношении терапии шизофрении известно, что антипсихотические препараты могут влиять на иммунную систему. Drzyga и соавт. провели исследование *in vitro*, показавшее, что антипсихотические препараты влияют на функцию иммунных клеток, что часто происходит очень скоро после первоначального воздействия препарата [38]. Имеются данные о снижении уровня IL-6 после проведенной терапии у пациентов с первым эпизодом шизофрении [39]. Другие исследования *in vitro* предполагают, что подавление опосредованной цитокинами активности микроглии может частично поддерживать эффективность некоторых антипсихотических препаратов [40]. Клозапин, наиболее эффективный антипсихотический препарат, выраженно влияет на иммунную систему, особенно хорошо известен его эффект на количество лейкоцитов (WBC). При этом данный препарат может оказывать немедленное [41] и долгосрочное воздействие на уровни IL-6, СРБ [42] и высокочувствительного СРБ (hs-СРБ) [43] при шизофрении.

В то же время важно учитывать, что помимо антипсихотической терапии на показатели IL-6 при шизофрении может оказывать влияние целый ряд сторонних факторов.

Влияние сторонних факторов. На уровни воспалительных маркеров могут влиять также другие препараты, употребление алкоголя и психоактивных веществ, секс, курение, индекс массы тела (ИМТ) и сопутствующие соматические заболевания [37].

Так, изменения цитокинов при шизофрении могут быть вторичными по отношению к увеличению веса. Пациенты с шизофренией подверже-

ны высокому риску метаболических нарушений и ожирения [44]. Ожирение при шизофрении усугубляется плохим питанием, малоподвижным образом жизни и антипсихотическими препаратами, особенно антипсихотиками второго поколения [45]. Адипоциты являются одним из основных источников продукции провоспалительных цитокинов, включая IL-6 [46].

Другим важным фактором, влияющим на показатели провоспалительных цитокинов и распространенным у пациентов с шизофренией, является курение. Отдельные исследования предпринимали попытки оценить эффект курения на показатели IL-6, однако были получены данные, что митоген-стимулированные показатели цитокина у пациентов с шизофренией не могли быть объяснены только курением [47].

Отдельное внимание необходимо уделить и вопросу негативных воздействий и их влияния на IL-6 в период внутриутробного и раннего детского развития. Работы с животными моделями показали, что воздействие бактериальных и вирусных инфекций с повышением IL-6 у мышей в период беременности вели к появлению потомства с более высоким риском нарушений поведения, схожих с фенотипами психотических нарушений [48]. Продольное исследование родителей и детей Avon (The Avon Longitudinal Study of Parents and Children) в свою очередь сообщало, что более высокие показатели IL-6 у детей в 9 лет почти в 2 раза увеличивали риск психоза после 18 лет [31].

Ограничения и перспективы текущих исследований. В то же время, несмотря на все вышеуказанное, данные о конкретных функциях IL-6 в механизмах развития шизофрении и других заболеваний остаются достаточно противоречивыми. Это может быть обусловлено несколькими причинами.

Во-первых, исследования провоспалительных цитокинов у пациентов с шизофренией отличаются высокой гетерогенностью выборок в отношении длительности, фазы, симптомов заболевания, проводимой терапии. Для IL-6, эффекты которого могут зависеть от флуктуации его показателей и специфичности клеточных/тканевых точек приложения, все эти факторы могут быть критичны. В связи с этим, для понимания роли IL-6 и других провоспалительных цитокинов в механизмах развития шизофрении крайне важно оценивать не единичный “срез”, а всю совокупность факторов в целом. Так, например, изменения уровней цитокинов могут лежать в основе взаимовлияния шизофрении, метаболических нарушений и антипсихотической терапии. Так по ряду наблюдений IL-6 повышает выработку лептина — гормона, который секретируется адипоцитами и влияет на регуляцию пищевого поведения, а также имеет нейротрофические функции [7, 9]. В свою очередь, по мнению ряда авторов, снижение продук-

ции IL-6 на фоне антипсихотической терапии ведет к уменьшению выработки лептина и формированию резистентности к нему [7, 9]. Предполагается, что это может влиять на активность мезолимбических дофаминергических нейронов гипоталамуса, а также повышению риска развития метаболического синдрома.

Другой значительной проблемой остается то, что на данный момент сведения о нейровоспалительных процессах при шизофрении лишены специфичности. Так, например, повышение провоспалительных цитокинов и нарушения нейрогенеза гиппокампа описаны также и для депрессивного расстройства [6]. При этом отмечается, что в этом отношении для шизофрении и депрессии схож и ряд сторонних эффектов психофармакотерапии в виде уменьшения воспаления и стимуляции нейрогенеза [6].

Более того, появляется все больше сведений о вовлеченности в патологические механизмы сравнительно малоизученных на настоящее время систем. Так, растет число сведений о роли микробиоты в регуляции иммунного ответа, в том числе и при различных психических расстройствах [49]. У пациентов с шизофренией также отмечалась повышенная активность воспалительных процессов кишечника, в особенности до назначения антипсихотических препаратов [50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время можно с уверенностью утверждать, что нейровоспалительные процессы играют значимую роль в этиопатогенезе шизофрении. В то же время вопрос: каким образом провоспалительные цитокины и, в частности, IL-6 участвуют в механизмах развития данного заболевания? — остается открытым.

Дихотомическое функционирование IL-6 может играть ключевую роль в регуляции как про-, так и противовоспалительных процессов. В связи с этим роль данного цитокина в этиопатогенезе шизофрении может зависеть от фазы заболевания и контекста воспалительного процесса (острое или хроническое воспаление). Таким образом основным ограничением в текущих исследованиях IL-6 является гетерогенность выборок с редким учетом стадии заболевания и внешних факторов.

При этом сведения о схожих нейровоспалительных механизмах шизофрении и депрессии указывают на необходимость изучения специфических изменений цитокинов при различных психических заболеваниях. Подобный подход может помочь выявить уникальные особенности этиологических процессов и функционирования цитокинов именно в контексте данного заболевания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO, *Schizophrenia* // <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
2. Рукавишников Г.В., Семенов И.В., Жуляева Т.В., Яковлева Ю.А., Манакова Э.А., Мазо Г.Э. // Российский психиатрический журнал. 2021. № 6. С. 43–48.
3. Kahn R.S., Sommer I.E., Murray R.M., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R., Cannon T.D., O'Donovan M., Correll C.U., Kane J.M., van Os J., Insel T.R. // Nat. Rev. Dis. Primers. 2015. V. 12. № 1. P. 15067.
4. Miller B.J., Buckley P., Seabolt W., Mellor A., Kirkpatrick B. // Biol. Psychiatry. 2011. V. 70. № 7. P. 663–71.
5. Potvin S., Stip E., Sepehry A.A., Gendron A., Bah R., Kouassi E. // Biol. Psychiatry. 2008. V. 63. № 8. P. 801–8.
6. Na K.S., Jung H.Y., Kim Y.K. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2014. V. 48. P. 277–286.
7. Borovcanin M.M., Jovanovic I., Radosavljevic G., Pantic J., Minic Janicijevic S., Arsenijevic N., Lukic M.L. // Front. Psychiatry. 2017. V. 8. P. 221.
8. Fang X., Wang Y., Chen Y., Ren J., Zhang C. // Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2019. V. 15. P. 2161–2170.
9. Zhou X., Tian B., Han H.B. // Cytokine. 2021. V. 141. P. 155441.
10. Максимов Н.М., Булгакова Т.С., Узбеков М.Г. // Социальная и клиническая психиатрия. 2019. Т. 29. № 3. С. 71–77.
11. Дубинина Е.Е., Щедрин Л.В., Мазо Г.Э. // Успехи физиологических наук. 2018. Т. 49. № 1. С. 28–49.
12. Lo Y.Y., Wong J.M., Cruz T.F. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 26. P. 15703–15707.
13. Lo Y.Y., Conquer J.A., Grinstein S., Cruz T.F. // J. Cell. Biochem. 1998. V. 69. № 1. P. 19–29.
14. Rothaug M., Becker-Pauly C., Rose-John S. // Biochimica et Biophysica. Acta (BBA). 2016. V. 1863. №. 6. Part A. P. 1218–1227.
15. Друцкая М.С., Носенко М.А., Атретханы К.С., Ефимов Г.А., Недоспасов С.А. // Молекулярная биология. 2015. Т. 49. № 6. С. 937–943.
16. Лисицына Т.А., Вельтищев Д.Ю., Лиля А.М., Насонов Е.Л. // Научно-практическая ревматология. 2019. Т. 57. № 3. С. 318–327.
17. Grivennikov S., Karin E., Terzic J., Mucida D., Yu G.Y., Vallabhapurapu S., Scheller J., Rose-John S., Cheroutre H., Eckmann L., Karin M. // Cancer Cell. 2009. V. 15. P. 103–113.
18. Rincon M., Irvin C.G. // Int. J. Biol. Sci. 2012. V. 8. P. 1281–1290.
19. Hegde S., Pahne J., Smola-Hess S. // FASEB J. 2004. V. 18. № 12. P. 1439–41.
20. Dominitzki S., Fantini M.C., Neufert C., Nikolaev A., Galle P.R., Scheller J., Monteleone G., Rose-John S., Neurath M.F., Becker C. // J. Immunol. 2007. V. 179. P. 2041–5.
21. Kimura A., Kishimoto T. // Eur. J. Immunol. 2010. V. 40. P. 1830–5.
22. Gruol D.L., Nelson T.E. // Mol. Neurobiol. 1997. V. 15. P. 307–339.
23. Yang P., Wen H., Ou S., Cui J., Fan D. // Exp. Neurol. 2012. V. 236. P. 19–27.
24. Taga T., Kishimoto T. // Curr. Opin. Immunol. 1995. V. 7. P. 17–23.
25. Atreya R., Mudter J., Finotto S., Müllberg J., Jostock T., Wirtz S., Schütz M., Bartsch B., Holtmann M., Becker C., Strand D., Czaja J., Schlaak J.F., Lehr H.A., Autschbach F., Schürmann G., Nishimoto N., Yoshizaki K., Ito H., Kishimoto T., Galle P.R., Rose-John S., Neurath M.F. // Nat. Med. 2000. V. 6. P. 583–588.
26. Nowell M.A., Richards P.J., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Topley N., Williams A.S., Jones S.A. // J. Immunol. 2003. V. 171. P. 3202–3209.
27. Campbell I.L., Erta M., Lim S.L., Frausto R., May U., Rose-John S., Scheller J., Hidalgo J. // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 2503–2513.
28. Chucair-Elliott A.J., Conrady C., Zheng M., Kroll C.M., Lane T.E., Carr D.J. // Glia. 2014. V. 62. P. 1418–1434.
29. Müller N., Myint A.M., Krause D., Weidinger E., Schwarz M.J. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2013. V. 42. P. 146–53.
30. Hunter C.A., Jones S.A. // Nat. Immunol. 2015. V. 16. № 5. P. 448–57.
31. Khandaker G.M., Pearson R.M., Zammit S., Lewis G., Jones P.B. // JAMA Psychiatry. 2014. V. 71. № 10. P. 1121–8.
32. Klein M.A., Moller J.C., Jones L.L., Bluethmann H., Kreutzberg G.W., Raivich G. // Glia. 1997. V. 19. P. 227–233.
33. Morrow J.D., Opp M.R. // Brain Behav. Immun. 2005. V. 19. P. 28–39.
34. Stojanovic A., Martorell L., Montalvo I., Ortega L., Monseny R., Vilella E., Labad J. // Psychoneuroendocrinology. 2014. V. 41. P. 23–32.
35. Borovcanin M., Jovanovic I., Radosavljevic G., Djukic Dejanovic S., Bankovic D., Arsenijevic N., Lukic M.L. // J. Psychiatr. Res. 2012. V. 46. № 11. P. 1421–6.
36. Goldsmith D.R., Rapaport M.H., Miller B.J. // Mol. Psychiatry. 2016. V. 21. № 12. P. 1696–1709.
37. Uptegrove R., Manzanares-Teson N., Barnes N.M. // Schizophr. Res. 2014. V. 155. № 1–3. P. 101–108.
38. Drzyzga L., Obuchowicz E., Marciniowska A., Herman Z.S. // Brain Behav. Immun. 2006. V. 20. № 6. P. 532–545.
39. Capuzzi E., Bartoli F., Crocamo C., Clerici M., Carrà G. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2017. V. 77. P. 122–128.
40. Bian Q., Kato T., Monji A., Hashioka S., Mizoguchi Y., Horikawa H., Kanba S. // Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2008. V. 32. № 1. P. 42–48.
41. Roge R., Moller B.K., Andersen C.R., Correll C.U., Nielsen J. // Schizophr. Res. 2012. V. 140. № 1. P. 204–213.
42. Kluge M., Schuld A., Schacht A., Himmerich H., Dalal M.A., Wehmeier P.M., Hinze-Selch D., Kraus T., Dittmann R.W., Pollmächer T. // Psychoneuroendocrinology. 2009. V. 34. № 1. P. 118–128.

43. *Loffler S., Loffler-Engraber M., Fehsel K., Klimke A.* // *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2010. V. 25. № 2. P. 101–106.
44. *Henderson D.C.* // *J. Clin. Psychiatry.* 2004. V. 66 (suppl 6). P. 11–20.
45. *Wirshing D.A.* // *J. Clin. Psychiatry.* V. 65 (suppl 18). P. 13–26.
46. *Trayhurn P., Wood I.S.* // *Br. J. Nutr.* 2004. V. 92. P. 347–355.
47. *Rapaport M.H., Bresee C.* // *Neuropsychopharmacology.* 2010. V. 35. P. 428–34.
48. *Meyer U., Feldon J.* // *Prog. Neurobiol.* 2010. V. 90. № 3. P. 285–326.
49. *Незнанов Н.Г., Леонова Л.В., Рукавишников Г.В., Касьянов Е.Д., Мазо Г.Э.* // *Успехи физиологических наук.* 2021. Т. 52. № 1. С. 64–76.
50. *Severance E.G., Alaedini A., Yang S., Halling M., Gressitt K.L., Stallings C.R., Halling M., Gressitt K.L., Stallings C.R., Origoni A.E., Vaughan C., Khushalani S., Leweke F.M., Dickerson F.B., Yolken R.H.* // *Schizophr. Res.* 2012. V. 138. № 1. P. 48–53.

Interleukin-6 Role in Schizophrenia Pathological Mechanisms

G. V. Rukavishnikov^a, T. V. Zhilyaeva^{a, b}, E. E. Dubinina^a, and G. E. Mazo^a

^a*Bekhterev National Medical Research Center for Psychiatry and Neurology, Saint-Petersburg, Russia*

^b*Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia*

It is assumed that schizophrenia may consist of extremely heterogeneous group of phenotypes with different biological and neurochemical pathological mechanisms. At the same time, much attention is paid to the potential role of the immune system in the development of schizophrenia and, in particular, the participation of various cytokines in these processes. Interleukin-6 (IL-6) is one of the key regulators of inflammatory processes. A number of studies have previously reported changes in its levels in patients with schizophrenia. However, data on the specificity of these changes in the literature are much less well-documented and sometimes even contradictory. The dichotomous functioning of IL-6 may play a key role in the regulation of both pro- and anti-inflammatory processes. In this regard, the role of this cytokine in the etiopathogenesis of schizophrenia may depend on the phase of the disease and the context of the inflammatory process. The aim of this review was to analyze in detail the role of IL-6 in the mechanisms of schizophrenia and its potential impact on the course, diagnosis and therapy of this disease.

Keywords: proinflammatory cytokines, IL-6, schizophrenia, etiopathogenesis, neuroinflammation

УДК 616.895.4:612.818.9

НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ КАК ТРАНСДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АФФЕКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

© 2023 г. Л. А. Левчук¹, *, Н. А. Бохан¹, С. А. Иванова¹

¹Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Поступила в редакцию 23.08.2022 г.

После доработки 18.10.2022 г.

Принята к публикации 22.10.2022 г.

Психические расстройства отличаются патогенезом и клинической картиной, однако для них характерны общие нейробиологические процессы, протекающие с нарушением структуры нервной ткани, повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера, включением аутоиммунных механизмов, нейродегенеративными процессами, выходом в периферический кровоток нейроспецифических белков. Представлен обзор современной литературы, посвященный исследованиям роли нейроспецифических белков в патогенезе аффективных расстройств. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок S-100B, основной белок миелина (MBP) и нейрон-специфическая енолаза (NSE) отражают астроцитарные, олигодендроцитарные и нейрональные повреждения при депрессивных расстройствах и их можно рассматривать как трансдиагностические неспецифические маркеры аффективных расстройств.

Ключевые слова: аффективные расстройства, повреждение ЦНС, нейроспецифические белки

DOI: 10.31857/S1027813323010119, **EDN:** EPHTRP

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ЦНС

Мозг человека — сложная, живая, высокоорганизованная структура, осуществляющая координацию адаптивных реакций в ответ на различные внешние и внутренние факторы. Для психических расстройств характерны нейробиологические процессы, протекающие с нарушением структуры нервной ткани, повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера, включением аутоиммунных механизмов. Практически любой патологический процесс в ЦНС проявляется дистрофическими изменениями нервной ткани и нейродегенеративными процессами (гибелью нейронов и потерей аксонов). Патологический процесс в ЦНС приводит к астроглиозу — выраженной активации астроглиального компонента нервной ткани, приводящей к гибели реактивных астроцитов, вследствие чего нарушается резистентность клеточной мембраны [1, 2]. Нейродегенеративные процессы, демиелинизация, глиоз приводят к атрофии (уменьшению объема) головного и спинного мозга. Атрофия ЦНС обусловлена и очаговой и диффузной потерей миелина, и нейродегенеративными изменениями с потерей аксонов и ней-

ронов, что отражается в уменьшении объема коры и подкорковых структур головного мозга [3, 4].

Несмотря на то, что очевидной нейропатологии или нейродегенерации в мозге пациентов с аффективными расстройствами не обнаружено, литературные данные указывают на то, что в лобных областях коры головного мозга субъектов с аффективной патологией количество глиальных клеток ниже, чем в контрольной группе непсихиатрического профиля [5–7]. Множество публикаций подтвердили участие воспалительных процессов в развитии и прогрессировании аффективного заболевания [8, 9]. Нерегулируемая активация микроглии, сверхэкспрессия провоспалительных цитокинов и их рецепторов и связанное с этим хроническое нейровоспаление могут оказывать прямое цитотоксическое действие и привести к нейродегенерации и снижению нейрогенеза [10, 11], на что указывает снижение экспрессии BDNF у пациентов с депрессивными расстройствами [12, 13], что, вероятно, связано со сниженными компенсаторными возможностями ремоделирования нейронных структур головного мозга у данных пациентов.

Нарушение структуры нервной ткани является одним из факторов хронизации нейродегенеративных процессов вследствие выхода в периферический кровоток нейроспецифических белков с последующим запуском механизмов иммунно-

* Адресат для корреспонденции: 634014, Томск, ул. Алеутская, 4, e-mail: rla2003@list.ru.

го ответа, синтезом соответствующих антител, аутосенсibilизацией, развитием вторичной нейродегенерации и нарушением нейротрансмиттерных систем. Дезинтеграция структурных и функциональных связей между нейронами и астроцитами, повреждение аксональных оболочек и олигодендроцитов приводит к нарушению глиотрансмиссии. Астроциты и клетки микроглии, являясь полифункциональными элементами, участвуют как при нормальном функционировании мозга, так и при патологии, обладают компенсаторным механизмом для восстановления поврежденной нейронной сети, реагируя на повреждение нейронов, изменяют экспрессию нейроспецифических белков, имеющих нейропластическое действие [8, 14]. В настоящее время известно более 100 нейроспецифических белков. Такие белки, как глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок S-100B, основной белок миелина (MBP) и нейрон-специфическая енолаза (NSE) являются хорошо известными маркерами для идентификации нейронального и глиального компонентов ткани мозга, задействованных в патологических состояниях.

БЕЛКИ, ОТРАЖАЮЩИЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ АСТРОЦИТОВ

Астроцитарная патология часто сопровождается психические расстройства [15, 16], а астроглиальные белки, такие как GFAP, представляют собой потенциальные маркеры психических расстройств, в том числе депрессивных [8, 17]. GFAP, являясь маркером с высокой специфичностью для повреждения мозга, играет важную роль в астроглиозе, активации клеток астроглии [18, 19]. Дальнейшее развитие патологического процесса приводит к гибели реактивных астроцитов, нарушению резистентности клеточной мембраны и выходу GFAP в межклеточное пространство, а затем в кровоток и ликвор пациента. Появление GFAP в биологических жидкостях организма свидетельствует о нарушении резистентности гематоэнцефалического барьера и несостоятельности эндотелия сосудов [20].

Измененная функция астроцитов в передней поясной коре и дорсолатеральной префронтальной коре может быть вовлечена в патофизиологию расстройств настроения. Иммуногистохимические исследования свидетельствуют о снижении пространственной протяженности, занимаемой иммунореактивными процессами GFAP, и уменьшении количества иммунопозитивных клеток в префронтальной коре пациентов с депрессией [21, 22]. X.R. Qi с соавторами [23] показана дисфункция астроцитов и снижение иммунореактивности GFAP в передней поясной коре пациентов с биполярным аффективным расстройством. Эти же исследователи сообщают о значительном увеличении уровня экспрессии мРНК астроцитарного маркера GFAP в передней поясной коре у

пациентов с биполярными аффективными расстройствами и тенденции к снижению данного показателя у пациентов с депрессивными расстройствами. J.J. Miguel-Hidalgo с соавторами [21] показана сниженная экспрессия GFAP у пациентов с депрессией, алкоголизмом и их коморбидном течении по сравнению со значениями здоровых лиц. Steinacker P. с соавторами [24] показала возможность использования сывороточного уровня GFAP для дифференциальной диагностики и оценки тяжести заболевания пациентов с депрессивными расстройствами. Таким образом, уровень GFAP в биологических жидкостях зависит от количества погибших или поврежденных астроцитов, отражая степень выраженности патологического процесса, может выступать в качестве маркера ранней диагностики повреждения головного мозга.

Другим маркером повреждения астроцитов является белок S-100B. Белок S-100B экспрессируется преимущественно астроцитами мозга, также незначительное количество продуцируется дифференцированными олигодендроцитами, предшественниками нервных клеток, питуицитами, эпендимоцитами [20]. Белки семейства S-100 участвуют в регуляции фосфорилирования белков, активности ферментов, экспрессии белков цитоскелета, транскрипционных факторов, пролиферации и дифференцировки клеток [25]. Эффекты S-100B на клетки-мишени зависят от его уровня. Наномолярные концентрации S-100B оказывают нейротекторное действие, усиливают пролиферацию клеток-предшественников гиппокампа, дифференцировку нейронов и когнитивное восстановление. В то время как микромолярные концентрации проявляют нейротоксическое действие, интенсифицируют процессы воспаления, противодействующего нейропластичности, вызывают гибель астроцитов и нейронов путем активации iNOs и продукции NO [26].

Работы F. Bartoli с коллегами [27], M.A. Ceschi [28] с соавторами и F. Michetti [29] с коллегами свидетельствуют о связи уровня S-100B с прогрессированием таких психических расстройств, как шизофрения и расстройства настроения. Исследование экспрессии генов в префронтальной коре в посмертных образцах L. Zhang с коллегами [30] выявило повышенную экспрессию гена S-100B в дорсолатеральной префронтальной коре пациентов с депрессией по сравнению с психически здоровыми лицами без суицидального поведения. В литературном обзоре H. Kroksmark, M. Vinberg [31] показана связь повышенного уровня S-100B в сыворотке крови с эпизодами настроения при аффективных расстройствах. Данные метаанализа U. Tural et al. [32] подтверждают корреляцию между уровнем S-100B в сыворотке крови и тяжестью депрессии у пациентов с большим депрессивным расстройством. Исследование R. Navines с коллегами [33] связи уровня белка S-100B с от-

ветом на терапию антидепрессантами показало, что высокий исходный уровень S-100B в сыворотке крови является предиктором ответа на терапию у пациентов с большим депрессивным расстройством. Многочисленные исследователи наблюдали повышенный уровень S-100B в сыворотке пациентов как с депрессивными, так и маниакальными эпизодами заболевания, а терапия литием эффективно снижала уровни S-100B [17, 34, 35]. В то же время M.L. Schroeter с соавторами [17] сообщает о возможности использования уровня белка S-100B в сыворотке в качестве маркера для дифференциации депрессивных и биполярных аффективных расстройств, поскольку уровень S-100B у людей с депрессивными эпизодами был значительно выше по сравнению с людьми с маниакальными эпизодами. Таким образом, измененная функция астроцитов вовлечена в патофизиологию расстройств настроения, вопрос об использовании сывороточных уровней GFAP и S-100B в качестве маркера для дифференциальной диагностики и оценки эффективности терапии аффективной патологии является актуальным.

МАРКЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ ОЛИГОДЕНДРОЦИТОВ

Дисфункция олигодендроцитов сопровождается нарушениями миелинизации и коннективности, нарушениями нейротрофических и восстановительных процессов на клеточном уровне, секрецией олигодендроцитами MBP, маркера нейродеструкции. MBP — это структурный гидрофильный белок, играющий решающую роль в организации, сборке и поддержании структурной целостности миелина, как в ЦНС, так и в периферической нервной системе [36]. Демиелинизация, нарушение целостности миелиновых мембран, сопровождается глиальную патологию и нарушение нейропластичности. Демиелинизация происходит после повреждения ЦНС и характеризуется выходом из пораженной ткани и накоплением MBP в спинномозговой жидкости, а, проникая через гематоэнцефалический барьер, MBP индуцирует синтез антител к миелину [37].

В исследованиях J.A. English с соавторами [38], M.R. Williams с коллегами [39] и M. Valdes-Tovar с соавторами [40] показано нарушение процессов миелинизации при различных психических расстройствах, в том числе аффективных расстройствах и шизофрении. A. Schmitt с соавторами [41] сообщают о повреждении миелиновых оболочек, дегенерации миелина и апоптозе/некрозе олигодендроцитов в сером и белом веществе префронтальной коры пациентов с шизофренией и аффективными расстройствами. J. Jakobsson с соавторами [42] предполагают, что высокие концентрации MBP могут быть индикатором связанного с депрес-

сией повреждения аксонов, сходного с дегенеративными процессами, наблюдаемыми у больных рассеянным склерозом. В своем исследовании L. Zhang с соавторами [30] наблюдали повышенную экспрессию гена MBP в дорсолатеральной префронтальной коре пациентов с депрессией, которая, как они предполагают, приводит к повышению уровня MBP в плазме крови. Нами выявлено увеличение содержания MBP в сыворотке крови пациентов с текущим депрессивным эпизодом и пациентов с коморбидностью синдрома зависимости от алкоголя и аффективных расстройств [43].

МАРКЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ

NSE — биомаркер нейронального повреждения, обладающий нейротрофическим и нейротекторным действием [44]. При нормальном функционировании организма в биологических жидкостях наблюдается низкое содержание NSE, однако сразу после повреждения нейрональных клеток NSE начинает выделяться в жидкости организма [45]. D.P. Streiburger с соавторами [46] показана корреляция NSE в сыворотке крови с объемом серого вещества у здоровых людей. X.F. Shi с коллегами [47] предполагают, что NSE, являясь распространенной гликолитической формой енолазы, обнаруженной во взрослых нейронах, и фактором роста нейронов, может способствовать энергетическому дисбалансу мозга при расстройствах настроения. H. Euge с соавторами [48] связывают уровень NSE в сыворотке крови с нарушениями структурной пластичности и снижением синаптической связи у пациентов с аффективными расстройствами. Многочисленными авторами показан вклад NSE в патогенез расстройств настроения, таких как депрессия и биполярное расстройство. В работах E. Gules с соавторами [8], L.A. Levchuk с соавторами [43] и F.M. Schmidt с соавторами [44] показано повышенное содержание NSE в плазме и сыворотке крови и спинномозговой жидкости пациентов с депрессивными расстройствами. В исследовании S. Karabulut с соавторами [9] выявлена прямая зависимость уровня NSE в плазме крови пациентов с биполярным аффективным расстройством от продолжительности заболевания.

Таким образом, дезинтеграция структурных и функциональных связей между нейронами и астроцитами, последующее снижение энергетического метаболизма и дисфункция глиотрансмиссии сопровождается нарушением экспрессии нейроспецифических белков. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок S-100B, основной белок миелина (MBP) и нейрон-специфическая енолаза (NSE) отражают астроцитарные, олигодендроцитарные и нейрональные повреждения при психических, в том числе аффективных расстройствах и их можно рассматривать в качестве трансдиагно-

стических неспецифических маркеров аффективных расстройств. Для психических расстройств характерны глиальные и нейрональные изменения, проявляющиеся метаболическими изменениями в длительности клеточных процессов, изменениями в молекулярных механизмах и снижении плотности глиальных клеток. Анализ современной литературы выявил ряд неизученных вопросов, разработка которых имеет значение для создания алгоритма диагностики психических расстройств для своевременной профилактики и лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Обзор подготовлен в рамках выполнения гранта РНФ № 22-15-00084 “Униполярная и биполярная депрессия: трансдиагностичность или специфичность потенциальных клинических, нейрофизиологических, молекулярно-биологических и метаболомных маркеров?”, <https://rscf.ru/project/22-15-00084/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maiolo L., Guarino V., Saracino E., Convertino A., Melucci M., Muccini M., Ambrosio L., Zamboni R., Benfenati V. // *Adv. Healthc. Mater.* 2021. V. 10. № 1. e2001268. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001268>
2. Mayegowda S.B., Thomas C. // *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2019. V. 30. № 4. <https://doi.org/10.1515/jbcp-2018-0120>
3. Franke H., Illes P. // *Neurosci. Lett.* 2014. V. 565. P. 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.056>
4. Kaul D., Schwab S.G., Mechawar N., Matosin N. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2021. V. 124. P. 193–215. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.01.025>
5. Keshavarz M. // *Acta Neuropsychiatr.* 2017. V. 29. № 3. P. 140–152. <https://doi.org/10.1017/neu.2016.56>
6. Rajkowska G., Miguel-Hidalgo J.J. // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1938. P. 247–254. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9068-9_17
7. Wang J., Qin J., Wang P., Sun Y., Zhang Q. // *Mediators Inflamm.* 2020. V. 2020, Article ID 3497920. <https://doi.org/10.1155/2020/3497920>
8. Gules E., Iosifescu D.V., Tural U. // *Neuropsychobiology.* 2020. V. 79. № 3. P. 214–221. <https://doi.org/10.1159/000505782>
9. Karabulut S., Taşdemir I., Akcan U., Kucukali C.I., Tuzun E., Çakır S. // *Türk. Psikiyatri Derg.* 2019. V. 30. № 2. P. 75–81.
10. Block M.L., Hong J.S. // *Prog. Neurobiol.* 2005. V. 76. № 2. P. 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
11. Zavorotnyy M., Zollner R., Schulte-Gustenberg L.R., Wulff L., Schoning S., Dannowski U., Kugel H., Arolt V., Konrad C. // *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2018. V. 125. № 2. P. 229–238. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1811-y>
12. Lotrich F.E., Butters M.A., Aizenstein H., Marron M.M., Reynolds C.F. 3rd, Gildengers A.G. // *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2014. V. 29. № 6. P. 635–44. <https://doi.org/10.1002/gps.4048>
13. Losenkov I.S., Mulder N.J.V., Levchuk L.A., Vyalova N.M., Loonen A.J.M., Bosker F.J., Simutkin G.G., Boiko A.S., Bokhan N.A., Wilffert B., Hak E., Schmidt A.F., Ivanova S.A. // *Front. Psychiatry.* 2020. V. 11. P. 38. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00038>
14. Erickson E.K., Grantham E.K., Warden A.S., Harris R.A. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2019. V. 177. P. 34–60. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.12.007>
15. Kruyer A., Kalivas P.W., Scofield M.D. // *Neuropsychopharmacology.* 2022. Epub ahead of print <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01338-w>
16. Wang Q., Jie W., Liu J.H., Yang J.M., Gao T.M. // *Glia.* 2017. V. 65. № 8. P. 1227–1250. <https://doi.org/10.1002/glia.23143>
17. Schroeter M.L., Sacher J., Steiner J., Schoenkecht P., Mueller K. // *Curr. Drug Targets.* 2013. V. 14. № 11. P. 1237–1248. <https://doi.org/10.2174/1389450113149990014>
18. Giovannoni F., Quintana F.J. // *Trends Immunol.* 2020. V. 41. № 9. P. 805–819. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007>
19. Gulyaeva N.V. // *J. Neurochem.* 2015. V. 132. № 3. P. 263–265. <https://doi.org/10.1111/jnc.13016>
20. Sofroniew M.V. // *Trends Immunol.* 2020. V. 41. № 9. P. 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>
21. Miguel-Hidalgo J.J., Waltzer R., Whittom A.A., Austin M.C., Rajkowska G., Stockmeier C.A. // *J. Affect. Disord.* 2010. V. 127. Issue 1–3. P. 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.06.003>
22. Kim R., Healey K.L., Sepulveda-Orengo M.T., Reissner K.J. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2018. V. 87. Pt A. P. 126–146. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.10.002>
23. Qi X.R., Kamphuis W., Shan L. // *Front. Cell Neurosci.* 2019. V. 13. P. 503. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00503>
24. Steinacker P., Al Shweiki M.R., Oeckl P., Graf H., Ludolph A.C., Schonfeldt-Lecuona C., Otto M. // *J. Psychiatr. Res.* 2021. V. 144. P. 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.09.012>
25. Donato R., Cannon B.R., Sorci G., Riuzy F., Hsu K., Weber D.J., Geczy C.L. // *Curr. Mol. Med.* 2013. V. 13. № 1. P. 24–57.
26. Baecker J., Wartchow K., Sehm T., Ghoochani A., Buchfelder M., Kleindienst A. // *J. Neurotrauma.* 2020. V. 37. № 8. P. 1097–1107. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6475>

27. Bartoli F., Misiak B., Crocamo C., Carra G. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2020. V. 101. P. 109922.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109922>
28. Ceschi M.A., da Costa J.S., Lopes J., Câmara V.S., Cam-
po L.F., Borges A., Goncalves C., de Souza D.F., Kon-
rath E.L., Karl A., Guedes I.A., Dardenne L.E. // Eur.
J. Med. Chem. 2016. V. 121. P. 758–772.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.025>
29. Michetti F., D'Ambrosi N., Toesca A., Puglisi M.A., Ser-
rano A., Marchese E., Corvino V., Geloso M.C. // J. Neu-
rochem. 2019. V. 148. № 2. P. 168–187.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14574>
30. Zhang L., Verwer R.W.H., Zhao J., Huitinga I., Lu-
cassen P.J., Swaab D.F. // J. Affect. Disord. 2021.
V. 295. P. 893–903.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.08.098>
31. Krokmark H., Vinberg M. // Nord. J. Psychiatry. 2018.
V. 72. № 7. P. 462–470.
<https://doi.org/10.1080/08039488.2018.1472295>
32. Tural U., Irvin M.K., Iosifescu D.V. // World J. Biol.
Psychiatry. 2021. V. 15. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1080/15622975.2021.2013042>
33. Navines R., Oriolo G., Horrillo I., Cavero M., Aouizerate B.,
Schaefer M., Capuron L., Meana J.J., Martin-Santos R. // Int.
J. Neuropsychopharmacol. 2022. V. 25. № 6.
P. 468–478.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyac016>
34. Andreazza A.C., Cassini C., Rosa A.R., Leite M.C.,
de Almeida L.M., Nardin P., Cunha A.B., Cereser K.M.,
Santin A., Gottfried C., Salvador M., Kapczinski F., Gon-
calves C.A. // J. Psychiatr. Res. 2007. V. 41. № 6. P. 523–
529.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.07.013>
35. Machado-Vieira R., Lara D.R., Portela L.V., Gon-
calves C.A., Soares J.C., Kapczinski F., Souza D.O. // Eur.
Neuropsychopharmacol. 2002. V. 12. № 3. P. 269–272.
[https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(02\)00029-9](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(02)00029-9)
36. Salzer J.L., Zalc B. // Curr. Biol. 2016. V. 26. № 20.
R971–R975.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.074>
37. Harauz G., Ladizhansky V., Boggs J.M. // Biochemistry.
2009. V. 48. № 34. P. 8094–104.
<https://doi.org/10.1021/bi901005f>
38. English J.A., Pennington K., Dunn M.J., Cotter D.R. // Biol.
Psychiatry. 2011. V. 69. № 2. P. 163–172.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.031>
39. Williams M.R., Sharma P., Macdonald C., Pearce R.K.B.,
Hirsch S.R., Maier M. // Eur. Arch. Psychiatry. Clin.
Neurosci. 2019. V. 269. № 4. P. 387–395.
<https://doi.org/10.1007/s00406-018-0904-4>
40. Valdes-Tovar M., Rodriguez-Ramirez A.M., Rodriguez-
Cardenas L., Sotelo-Ramirez C.E., Camarena B.,
Sanabrais-Jimenez M.A., Solis-Chagoyan H., Argueta J.,
Lopez-Riquelme G.O. // World J. Psychiatry. 2022.
V. 12. № 2. P. 264–285.
<https://doi.org/10.5498/wjp.v12.i2.264>
41. Schmitt A., Simons M., Cantuti-Castelvetri L., Falkai P. // Eur.
Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2019. V. 269. № 4.
P. 371–372.
<https://doi.org/10.1007/s00406-019-01019-8>
42. Jakobsson J., Bjerke M., Ekman C.J., Sellgren C., Jo-
hansson A.G., Zetterberg H., Blennow K., Landen M. // Neuropsychopharmacology. 2014. V. 39. № 10.
P. 2349–2356.
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.81>
43. Levchuk L.A., Roshchina O.V., Simutkin G.G.,
Bokhan N.A., Ivanova S.A. // Neurochemical Journal.
2021. V. 15. № 1. P. 86–90.
<https://doi.org/10.1134/S1819712421010074>
44. Schmidt F.M., Mergl R., Stach B., Jahn I., Schonknecht P. // World J. Biol. Psychiatry. 2015. V. 16. P. 106–113.
<https://doi.org/10.3109/15622975.2014.952776>
45. Isgro M.A., Bottoni P., Scatena R. // Adv. Exp. Med. Bi-
ol. 2015. V. 867. P. 125–143.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_9
46. Streitburger D.P., Arelin K., Kratzsch J., Thiery J., Stein-
er J., Villringer A., Mueller K., Schroeter M.L. // PLoS
One. 2012. V. 7. № 8. e43284.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043284>
47. Shi X.F., Kondo D.G., Sung Y.H., Hellem T.L., Fiedler K.K.,
Jeong E.K., Huber R.S., Renshaw P.F. // Bipolar Disord.
2012. V. 14. № 6. P. 607–617.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2012.01040.x>
48. Eyre H., Baune B.T. // Psychoneuroendocrinology.
2012. V. 37. № 9. P. 1397–1416.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.03.019>

Neurospecific Proteins as Transdiagnostic Markers of Affective Disorders

L. A. Levchuk^a, N. A. Bokhan^a, and S. A. Ivanova^a

^aMental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Mental disorders have many differences in pathogenesis and clinical symptoms, however, they are characterized by general neurobiological processes that occur with a damage of nervous tissue, disturbance of blood-brain barrier, inclusion of autoimmune mechanisms, neurodegenerative processes and release of neurospecific proteins into the liquor and into the blood. We presented a review of current literature devoted to studies of the role of neurospecific proteins in the pathogenesis of affective disorders. Glial fibrillar acidic protein (GFAP), S-100 protein, myelin basic protein (MBP), and neuron specific enolase (NSE) reflect damage of neurons, astrocytes and oligodendrocytes in depressive disorders and they could be considered as transdiagnostic nonspecific markers of affective disorders.

Keywords: affective disorders, damage of CNS, neurospecific proteins

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

УДК 612.822.3

О СХОДСТВЕ МЕХАНИЗМОВ ОБРАБОТКИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ, СЛУХОВОЙ И ЗРИТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ В ЦНС (ГИПОТЕЗА)

© 2023 г. И. Г. Силькис*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.11.2022 г.

После доработки 08.11.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

Предложен возможный механизм обработки запахов в нейронной сети, которая включает обонятельную луковицу, пириформную кору, обонятельный бугорок, являющийся частью вентрального стриатума, вентральный паллидум, медиодорзальное таламическое ядро и орбитофронтальную кору. Согласно этому механизму, дофамин, выделяющийся нейронами среднего мозга в ответ на запах и на подкрепление, как и антагонисты аденозиновых рецепторов, определенным образом модулируют эффективность возбудительных синаптических входов к шипиковым клеткам обонятельного бугорка, проецирующихся в вентральный паллидум. В результате происходит растормаживание со стороны вентрального паллидума нейронов обонятельной луковицы, которое способствует формированию на них, а также на их клетках-мишенях в пириформной коре контрастных отображений запахов. Одновременно происходит растормаживание нейронов медиодорзального ядра и увеличение активности их клеток-мишеней в орбитофронтальной коре, которая возбуждает нейроны пириформной коры. Это способствует индукции длительной потенциации на входах из обонятельной луковицы в пириформную кору и запоминанию отображений запахов. Впервые указано на то, что механизм обработки запахов аналогичен предложенному автором ранее механизму обработки слуховой и зрительной информации в топографически организованных цепях кора–базальные ганглии–таламус–кора, которые включают первичные и высшие области слуховой и зрительной коры, а также префронтальную кору. Предполагено, что механизм обработки обонятельной информации аналогичен у позвоночных, находящихся на разных стадиях эволюции, включая миног, вследствие сходства функциональной организации базальных ганглиев и их связей с другими структурами. Из предлагаемого механизма следует, что в тех случаях, когда дофаминовые препараты не эффективны для восстановления обоняния, желательно использовать антагонисты аденозиновых A2A рецепторов. В пользу этого предсказания свидетельствуют данные об улучшении обоняния у пациентов с COVID-19 при их лечении антагонистами A2A рецепторов.

Ключевые слова: обонятельная луковица, обонятельный бугорок, пириформная кора, базальные ганглии, синаптическая пластичность, дофамин

DOI: 10.31857/S1027813323010193, **EDN:** ERMMSU

ВВЕДЕНИЕ

Различение запахов возникает уже на ранних стадиях эволюции и является одним из необходимых условий выживания и адекватного поведения.

Принятые сокращения. БГ – базальные ганглии; ВП – вентральный паллидум; ВПП – вентральное поле покрышки; ДД и ДП – длительная депрессия и потенция эффективности возбудительной синаптической передачи, соответственно; К–БГ–Т–К – нейронная цепь кора–базальные ганглии–таламус–кора; МДЯ – медиодорзальное ядро таламуса; ОБ – обонятельный бугорок; ОЛ – обонятельная луковица; ОФК – орбитофронтальная кора; ПК – пириформная кора; зПК и пПК – задняя и передняя части ПК соответственно; ПОЯ – переднее обонятельное ядро; ПфК – префронтальная кора; ПЯ – прилежащее ядро; ЧВк и ЧВр – компактная и ретикулярная части черного вещества соответственно

* Адресат для корреспонденции: 117865 Москва, ул. Бутлерова, д. 5а; тел.: 495-789-3852, email: isa-silkis@mail.ru.

Обонятельная система млекопитающих сравнительно хорошо изучена и обладает способностью к пластичности на разных уровнях обработки, включая обонятельную луковицу (ОЛ) и пириформную кору (ПК). Как и в других сенсорных системах, на пластичность в обонятельной системе могут влиять нисходящие воздействия из областей мозга, участвующих в процессах внимания и обучения [1]. В обработке обонятельной информации, поступающей в ОЛ от обонятельных сенсорных нейронов, участвует также обонятельный бугорок (ОБ), являющийся частью вентрального стриатума, который называют прилежащим ядром (ПЯ). Стриатум является входной структурой базальных ганглиев (БГ), получающей возбуждение из коры и таламуса. В ОБ поступают сигналы из ОЛ и ПК (рис. 1). Нейрохимический состав ОБ

[13], тогда как их восприятие требует интеграции с высшими корковыми областями [18].

От выходных митральных клеток ОЛ сигналы поступают в переднее обонятельное ядро (ПОЯ), а от него в ПК [19] (рис. 1). Нейроны ПОЯ отвечают на запах возбуждением, торможением и отставленным возбуждением [20]. В ПОЯ, реципрокно связанном с ОЛ и с ПК, имеются две области, которые реагируют на запахи различным образом. Во внешней части ПОЯ, как и в ОЛ, запахи отображаются топографически. В другой части ПОЯ отображение запахов является распределенным, как и в ПК [21]. Полагают, что поскольку в ПОЯ имеются пирамидные нейроны, по свойствам сходные с нейронами коры, его правильней считать корой [22]. Вход из ПОЯ может приводить к значительному усилению активности нейронов ПК, так как он активирует на этих клетках НМДА-рецепторы и оказывает на них лишь слабое дисинаптическое торможение [23]. Об эффективности передачи сигналов в цепи ОЛ–ПОЯ–ПК свидетельствуют данные о том, что стимуляция ОЛ с частотой 100 Гц приводит к появлению сравнительно сильных ответов в ПОЯ и ПК [19]. Спонтанная активность нейронов ОЛ приводит к спонтанной активности нейронов ПК. Появление запаха вызывает ответ нейронов во втором слое ПК, при этом примерно у 15% клеток спонтанная активность увеличивается, а примерно у 15% – ингибируется [24].

Обонятельная кора имеет определенное сходство с неокортексом [25]. Например, в первичных сенсорных областях неокортекса дендриты пирамидных клеток ветвятся меньше, чем в высших. Аналогично, в той части обонятельной коры, которая ближе к ОЛ (в одной из частей ПОЯ), нейроны имеют меньшие пространственные размеры и более короткие дендриты, по сравнению с нейронами в задней части ПК (зПК) [25], где, по-видимому, осуществляется более высокая степень обработки. Каждый нейрон ПК через ПОЯ получает конвергентные входы от гломерул ОЛ. Показано, что при поступлении возбуждения от одного обонятельного сенсорного нейрона активируется небольшая хорошо очерченная область (пятно) в передней части ПК (пПК), но эта область много больше, чем область в ОЛ [26]. Рецептивные поля запахов в пПК сравнимы с рецептивными полями митральных/пучковых клеток ОЛ, причем рецептивные поля нейронов в ПК высоко динамичны [15]. Отдельные пирамидные клетки ПК соединены между собой тысячами возбуждательных синаптических связей, которые распространяются в ПК, в основном, без ослабления, образуя большую возбужденную сеть. На активность нейронов ПК влияет и возвратное торможение. Вызванное запахом ингибирование пирамидных нейронов ПК было распространено гораздо более широко, чем возбуждение [18]. Поскольку в пПК имеются 6 типов тормозных интернейронов [27], не исключено, что может иметь место не только ингибирование,

но и растормаживание. Благодаря наличию рекуррентной сети, афферентный вход может усиливаться или подавляться, способствуя формированию в ПК ансамблей клеток, кодирующих запахи [28]. При передаче сигналов от митральных/пучковых клеток ОЛ в обонятельную кору в ней формируется карта объектов запаха [29].

В отличие от ОЛ, в ПК нет деления на определенные группы клеток, реагирующих на определенный запах, а образуется распределенная сеть, в которой разные запахи активируют уникальные, но рассредоточенные ансамбли корковых нейронов, причем у нейронов ПК могут быть перекрывающиеся рецептивные поля [30]. Таким образом, ПК отличается от других сенсорных областей новой коры, в которой клетки, отвечающие на сходные свойства стимула, образуют кластеры [30]. У большинства позвоночных обонятельная система имеет большое представительство в старой коре, а у млекопитающих обонятельные представительства есть и в неокортексе, включая каудальную часть орбитофронтальной коры (ОФК) [31, 32]. Вход из ПК в ОФК организован топографически, при этом аксоны выходных нейронов ПК группируются в параллельные пучки, которые передают обонятельную информацию в области коры более высокого порядка [33]. Этот корковый компонент вносит значительный вклад в восприятие запахов. В свою очередь, каудальная часть медиальной ОФК влияет на активность нейронов вентрального поля покрышки (ВПП), регулируя концентрацию дофамина в вентральном стриатуме и определяя характер целенаправленного поведения [34].

Из-за большого числа функций, приписываемых ПК, полагают, что это не простая первичная сенсорная область коры, а ассоциативная, которая способна интегрировать входящую обонятельную информацию с нисходящей, поступающей из ассоциативных областей более высокого порядка, таких как ОФК [35, 36]. Динамическое взаимодействие ПК с другими обонятельными и не обонятельными областями имеет решающее значение для формирования обонятельного восприятия и поведенческих реакций [36]. У человека в ответ на запах паттерны активности обнаружены как в ПОЯ и ОБ, так и во фронтальной и височной областях коры [37].

Аксоны нейронов ПОЯ и ПК проецируются обратно в ОЛ [38] (рис. 1). При этом центрофугальные нейроны ПК, иннервирующие клетки зернистого слоя ОЛ мыши, группировались в кластеры [39]. Поскольку в отдельные гломерулы ОЛ поступает иннервация от клеток коры, настроенных на различные запахи, кора может модулировать ранние отображения запахов в ОЛ, диффузно передавая сенсорную информацию в ее пространственно упорядоченную сеть [40]. Возбуждение из ПК поступает как на основные клетки ОЛ, так и на ГАМКергические гранулярные клетки, являющиеся основным источником торможения выходных нейронов, причем этот вход является пластичным

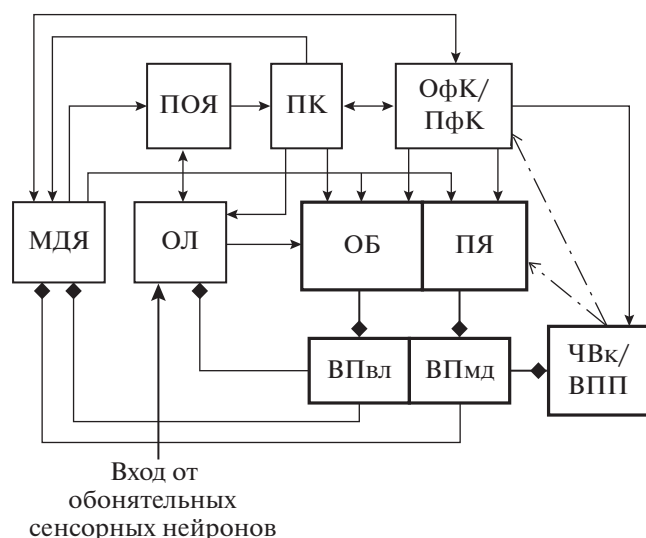


Рис. 2. Схема организации межнейронных связей в нейронной сети, в которой обрабатывается обонятельная информация. МДЯ — медиодорзальное ядро таламуса; ВПВЛ и ВПМД — вентролатеральная и медиодорзальная части вентрального паллидума; ПФК — префронтальная кора; ПЯ — прилежащее ядро. Остальные обозначения как на рис. 1.

[18, 41]. Ингибирование основных клеток ОЛ позволяет “очерчивать” их активность и способствует дискриминации запахов. Кроме того, на митральные клетки ОЛ влияют дофаминергические интернейроны [42, 43]. Полагают, что прямые и обратные проекции ОЛ и ПК играют разную функциональную роль в кодировании информации о запахах [39].

Обоняние является единственной сенсорной системой без прямых таламических проекций. Было предположено, что ОЛ и ПОЯ фактически являются таламическими суррогатами [44]. Авторы работы [45] полагают, что ОЛ выполняет роль, сравнимую с таламусом и первичным зрительным полем V1 в зрительной системе. Согласно гипотезе, выдвинутой авторами работы [9], ОЛ играет ту же роль, что и таламус. Нейроны таламических ядер разделяют на нейроны сердцевины и матрикса. Именно нейроны матрикса проецируются в пространственно распределенные области верхних слоев коры диффузным образом. Нейроны матрикса таламуса иннервируют также БГ, причем один нейрон иннервирует обе структуры [46]. Поскольку аксоны нейронов каждой из гломерул ОЛ диффузно проецируются в ПК [47], они по свойствам схожи с клетками матрикса таламуса. Например, центромедианное ядро таламуса содержит только клетки матрикса [48]. Следует отметить, что нейроны срединных ядер таламуса иннервируют и стриатум, и те области коры, которые обеспечивают кортикальные входы к тем же самым компартментам в стриатуме [49]. Таким образом, цепи К—БГ—Т—К являются замкнутыми. Хотя не

исключено, что нейроны одной и той же гломерулы ОЛ иннервируют как ОБ, так и ПК, нейроны которой проецируются в ту же область ОБ, что и нейроны этой гломерулы, таких данных нами не найдено.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И МЕЖНЕЙРОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СЕТИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ ОБОНЯТЕЛЬНЫЙ БУГОРОК

Обонятельный бугорок является вентральным продолжением раковины ПЯ и представляет собой узел в мезолимбическом дофаминергическом пути [5, 50, 51]. Между ОБ и ПЯ имеется функциональное сходство [51]. В ОБ, как и в ПЯ, проецируются дофаминергические нейроны из ВПП и компактной части черного вещества (ЧВк) [2, 4] (рис. 1 и 2) и в нем высокая концентрация дофамина [52]. Проекция из разных частей ВПП в ОБ и ПЯ организованы определенным образом. Дофаминергические клетки задней медиальной части ВПП проецируются в вентромедиальный стриатум (ОБ и раковину медиальной части ПЯ), а клетки латеральной части ВПП проецируются в вентролатеральный стриатум (латеральную часть ОБ, сердцевину ПЯ и латеральную часть раковины ПЯ) [50]. Дофаминергические клетки ЧВк, по-видимому, иннервируют латеральную часть ОБ, так как у мутантных мышей с уменьшенным числом дофаминергических клеток в ЧВк именно в этой части ОБ наблюдали дефицит дофамина [53]. У таких мышей концентрация дофамина в ОБ была снижена на 27%, а в стриатуме на 75% [54]. По-видимому, различие связано с тем, что большая часть проекций из ЧВк поступает в дорзальную моторную часть стриатума. Приведенные данные указывают на разный характер влияния дофамина на функционирование нейронных цепей, включающих разные участки стриатума.

Наиболее распространенным типом клеток в ОБ, как и в ПЯ и дорзальном стриатуме, являются шипиковые клетки среднего размера [55]. Они составляют 90–95% от всего числа нейронов [56]. Как и в других частях стриатума, на шипиковых клетках ОБ располагаются дофаминовые D1 и D2 рецепторы [3, 5] (рис. 1). Эти рецепторы в основном постсинаптические и располагаются на дендритах и головках шипиков [57]. В ОБ D1 рецепторы преимущественно располагаются на клетках, экспрессирующих динорфин и вещество P, а D2 рецепторы — на клетках, экспрессирующих энкефалин [58]. Примечательно, что в ОБ 51% клеток экспрессируют препродинорфин, а 19% клеток — препроэнкефалин, причем эти клетки располагаются в плотном клеточном слое ОБ (т.е. в слое, где оканчиваются афференты из ПК), тогда как клетки, экспрессирующие динорфин и энкефалин найдены во всех частях ПЯ [59]. Если учесть, что динорфин выделяется из аксонных окончаний стрионигральных клеток, на которых располагаются D1 рецепторы, а энкефалин — из аксон-

ных стриопаллидарных, на которых располагаются Д2 рецепторы, результаты работы [59] указывают на то, что ПК возбуждает в ОБ больше стрионигральных клеток.

Стрионигральные шипиковые нейроны проецируются в ретикулярную часть черного вещества (ЧВр) — одного из выходных ядер БГ [60]. В другую выходную структуру БГ — вентральный паллидум (ВП) проецируются нейроны ОБ, экспрессирующие как энкефалин, так и вещество *P* [61], т.е. и стриопаллидарные, и стрионигральные. То, что нейроны ОБ проецируются как в ЧВр, так и в ВП, показано в работе [2]. Множественные эфферентные окончания проекционных шипиковых нейронов латеральной части ОБ, формирующие вентральный стриопаллидарный путь, поступают в основном в вентролатеральную часть ВП, но некоторые поступают в вентромедиальную часть ВП, тогда как шипиковые клетки ПЯ проецируются в более медиодорзальные части ВП [62, 63] (рис. 2). В ВП проецируются шипиковые клетки ПЯ, на которых располагаются как Д1, так и Д2 рецепторы [64]. Из приведенных данных следует, что связи ОБ с выходными структурами БГ аналогичны связям ПЯ с этими структурами.

В ОБ поступает возбуждение от нейронов ОЛ, ПОЯ, ПК и орбитальной коры [2]. В отличие от ПЯ, в котором нет послышной организации, в ОБ имеется три клеточных слоя [65, 66]. В молекулярный плексиформный слой 1 поступают афференты из ОЛ [67]. В плотном слое 2 располагаются тела шипиковых клеток [68]. В наиболее глубокий и заполненный слой 3 поступают многочисленные афференты из ПК [69]. В ОБ особенно много афферентов из вентрокаудальной части ПК [70]. В ОБ проецируются как митральные, так и пучковые клетки ОЛ, причем пучковые клетки, проецирующиеся в слой 1 антеролатеральной части ОБ, являются основным источником иннервации ОБ [63]. Те клетки ПК, которые получают возбуждение от пучковых клеток ОЛ, проецируются в слои 2 и 3 антеролатеральной части ОБ [63]. Таким образом обонятельная информация из ОЛ поступает в эту часть ОБ моно- и дисинаптически. Кроме того, нейроны ОБ получают иннервацию от пирамидных клеток ПК, возбуждаемых в основном митральными клетками ОЛ.

Эти данные не исключают возможности того, что, как и в других сенсорных цепях, связывающих таламус, кору и стриатум, нейроны одной гломерулы ОЛ иннервируют те нейроны ПК, которые проецируются в ту же область ОБ, что и нейроны этой гломерулы. Полагают, что в ОБ в значительной степени отсутствует топография [71]. Такую особенность объясняют диффузностью проекций нейронов отдельных гломерул ОЛ в ПК [47], нейроны которой, в свою очередь, возбуждают ОБ. Следует отметить, что ответы на запах нейронов в ОБ и ПК сходны по амплитуде, латентному периоду и ширине полосы настройки [72].

В латеральные части ОБ и ПЯ, а также в ПОЯ поступает возбуждение из медиодорзального ядра (МДЯ) таламуса [73] (рис. 2). Это таламическое яд-

ро возбуждает медиальную префронтальную кору (ПфК) и ОфК, которая реципрокно связана с ПК [31, 74]. Найдены проекции из ПК в центральную и медиальную части МДЯ и в латеральную орбитальную кору [75]. В свою очередь, МДЯ, а также ПОЯ и ПК получают возбуждение из медиальной ПфК, которая также иннервирует ОБ [76, 77]. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что входы из ОЛ и ПК поступают в разные слои ОБ, тогда как на нейронах ПЯ входы из ПфК конвергируют с входами от таламических ядер средней линии, с которыми ПфК реципрокно связана [78]. Нейроны ОБ и ПЯ проецируются соответственно в вентролатеральную и вентромедиальную части ВП [79] (рис. 2). Эти данные указывают на разную функциональную роль нейронных цепей, включающих ОБ и ВП. Из общего числа исследованных нейронов вентральной паллидарной области 30% проецировались в ЧВр, 43% — в субталамическое ядро и 6% — в МДЯ [80]. Нейроны вентромедиальной части ВП, которую иннервируют шипиковые клетки раковины ПЯ, также проецируются в МДЯ и ВПП [81] (рис. 2). Кроме того, в МДЯ поступают афференты из ЧВр [82]. Нейроны ВП иннервируют все отделы центрального и медиального сегментов МДЯ, перекрываясь с волокнами из ПК, тогда как волокна из других частей паллидума и ЧВр заканчиваются в латеральной и вентральной частях МДЯ, где они перекрываются с входами от верхнего двухолмия и других структур ствола мозга [72]. Из этих данных следует, что только определенные части МДЯ вовлечены в обонятельные цепи. Те нейроны ВП, которые получают иннервацию от шипиковых клеток ОБ и проецируются в МДЯ, имеют удивительное сходство с проекционными клетками энтопедункулярного ядра (аналога внутренней части бледного шара млекопитающих), которое, как и ЧВр, является выходным ядром БГ [83]. Существующие данные позволили авторам работы [80] прийти к заключению, что ВП по существу участвует во внутренних цепях БГ и потому его нельзя рассматривать как основную выходную структуру.

На последовательность распространения сигналов в обонятельной цепи указывают данные о том, что искусственно вызванная в ОЛ судорожная активность распространяется вначале в ПОЯ, потом в ПЯ, ВП и бледный шар, затем в ЧВр и энтопедункулярное ядро, а потом в МДЯ и другие таламические ядра [84]. По аналогии с организацией цепей К—БГ—Т—К, участвующих в обработке зрительных, слуховых и соматосенсорных стимулов [6, 7, 85], и с учетом того, что ОЛ может выполнять функцию таламуса [9], можно ожидать, что в ОЛ поступает иннервация от ГАМКергических нейронов выходных ядер БГ, в которые проецируются шипиковые нейроны ОБ. Наличие ГАМКергических проекций из ВП в ОЛ продемонстрировано в работе [86]. Судя по результатам работы [87], в ОЛ имеются входы из ЧВ.

ГИПОТЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ОБРАБОТКИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ

В предшествующих работах [6, 7] был предложен механизм обработки зрительной и слуховой информации, который базируется на дофамин-зависимой реорганизации активности в топографически организованных нейронных цепях К—БГ—Т—К. Дофамин способствует индукции длительной потенциации (ДП) на возбуждательных входах к стрионигральным клеткам, на которых преимущественно располагаются Д1 рецепторы и которые дают начало прямому растормаживающему пути через БГ. Одновременно дофамин способствует индукции длительной депрессии (ДД) на возбуждательных входах к стриопаллидарным клеткам, на которых преимущественно располагаются Д2 рецепторы и которые дают начало непрямому ингибирующему пути через БГ (рис. 1). В результате этого, синергично ослабляется ингибирование со стороны выходных ядер БГ тех нейронов таламуса, которые первоначально были сильно активированы сенсорным стимулом, так что их активность увеличивается и возрастает активность топографически связанных с ними нейронов новой коры [7, 85]. Поскольку правила модификации сильных и слабых возбуждательных входов в стриатум противоположны по знаку, дофамин-зависимая реорганизация активности в цепи К—БГ—Т—К одновременно приводит к ослаблению активности нейронов таламуса и коры, первоначально слабо активированных сенсорным стимулом [7, 85].

С учетом этого механизма, а также с учетом изложенных выше особенностей взаимосвязей в нейронной сети, включающей ОЛ, ПОЯ, ПК, ОБ и ВП, в настоящей работе предложен следующий гипотетический механизм обработки информации в обонятельной цепи. При поступлении сигналов о некоем запахе в ОЛ сильнее всего активируются нейроны, рецептивные поля которых настроены на этот запах и которые сгруппированы в определенной гломеруле. Затем сигнал передается в ближайшую к ОЛ часть ПОЯ, где также активируется компактно расположенная группа клеток со сходными рецептивными полями. От нее сигналы распространяются в другую часть ПОЯ, а затем в прилегающую к ней ПК, где наиболее сильно активируются распределенные группы нейронов с рецептивными полями, настроенными на этот запах. Сигналы от них и от нейронов из соответствующей гломерулы ОЛ иннервируют шипиковые клетки ОБ. Как появление запаха, так и его подкрепление во время обучения, должны вызывать реакции дофаминергических клеток ВПП и ЧВк. Воздействие дофамина на стрионигральные и стриопаллидарные шипиковые клетки ОБ должно приводить к индукции соответственно ДП и ДД на их сильных возбуждательных входах. Важно подчеркнуть, что моносинаптическую иннервацию от глутаматергических нейронов пПК получают популяции шипиковых нейронов ОБ и с Д1,

и с Д2 рецепторами [70]. Поэтому, одновременно активируются прямой и непрямой пути через обонятельную часть БГ. Дофамин-зависимая модуляция эффективности синапсов в ОБ приводит к определенной реорганизации активности в нейронной цепи, связывающей ОЛ, ПОЯ, ПК, ОБ, ВП и ЧВр (рис. 2). Через прямой путь в БГ, начало которому дают стрионигральные клетки ОБ, проецирующиеся в ЧВр и часть ВП, усиливается растормаживание нейронов в той гломеруле ОЛ, которая первоначально была сильно активирована поступившим запахом. Одновременно усилится их растормаживание через непрямой путь в БГ, начало которому дают стриопаллидарные клетки ОБ, проецирующиеся в другую часть ВП. В результате увеличится активность нейронов этой гломерулы ОЛ и их клеток-мишеней в ПОЯ и ПК.

К слабым возбуждательным входам к шипиковым клеткам ОБ относятся те, которые не приводят к открыванию НМДА каналов. Под действием дофамина на слабых возбуждательных входах к стрионигральным и стриопаллидарным шипиковым клеткам индуцируются соответственно ДД и ДП. Поэтому, после прохождения активности через ОБ и ВП должно усилиться ингибирование нейронов в тех гломерулах ОЛ, нейроны которых первоначально были слабо возбуждены поступившим запахом. В результате должна уменьшиться активность этих нейронов и их клеток-мишеней в ПОЯ и ПК. Таким образом, вызванная дофамином реорганизация активности в цепи ПК—ОБ—ВП—ОЛ—ПОЯ—ПК должна приводить к формированию контрастного отображения подкрепляемого запаха в активности нейронов ОЛ и ПК.

В ОБ, как и в ПЯ, велика плотность аденозиновых A2A рецепторов [88]. Эти рецепторы в основном постсинаптические и располагаются на дендритах и дендритных шипиках стриопаллидарных клеток в области окончаний глутаматергических терминалей [89]. Нейроны ОБ, на которых располагаются A2A рецепторы, проецируются в ВП [90]. Ранее нами был проведен анализ возможных причин предпочтительного использования антагонистов A2A рецепторов для улучшения функционирования цепей К—БГ—Т—К [91]. В применении к моторным цепям К—БГ—Т—К этот анализ позволил объяснить, почему антагонисты A2A рецепторов позволяют ослабить двигательные нарушения при болезни Паркинсона и заменить дофаминергические препараты, которые вызывают привыкание и могут приводить к нежелательным побочным эффектам [91]. Поскольку в ОБ, как и в дорзальном стриатуме, связанные с Gs-белками аденозиновые A2A рецепторы [92] располагаются на стриопаллидарных клетках, на которых имеются и связанные с Gi/0 белками D2 рецепторы, по аналогии с механизмом функционирования моторной цепи К—БГ—Т—К можно полагать, что антагонисты A2A рецепторов будут оказывать на функционирование цепи ПК—ОБ—ВП—ОЛ—ПК такое же действие, как и агонисты дофаминовых D2 рецепторов, т.е. способствовать растормаживанию сильно активированных нейро-

нов ОЛ и МДЯ со стороны ВП. Это приведет к увеличению их активности, а также активности связанных с ними нейронов ПК и ОфК. В результате обоняние должно улучшиться. В пользу важности вклада непрямого пути через БГ в обработку запахов могут служить данные о том, что генно-модифицированным мышам с отсутствием Д2 рецепторов требовалось гораздо больше обучающих проб для распознавания подкрепляемого запаха [93].

При анализе влияния дофамина на функционирование обонятельной сети следует учитывать то обстоятельство, что дофаминергические нейроны ВПП и ЧВк проецируются и в ОЛ [87], а также что в обнаружении и дискриминации запахов важную роль играют дофаминергические интернейроны ОЛ [94]. В ОЛ дофамин воздействует на разные типы клеток, на которых имеются Д1 и Д2 рецепторы. Например, активация Д1 рецепторов уменьшала ток через ГАМК_A рецепторы на тормозных интернейронах ОЛ за счет их фосфорилирования протеинкиназой А [95]. Это согласуется с предложенными нами правилами модуляции эффективности ГАМК_A рецепторной передачи [96, 97]. В результате активность интернейронов должна увеличиться, что приведет к усилению ингибирования основных клеток. Снижению активности митральных/пучковых клеток ОЛ способствовало и воздействие дофамина на расположенные на этих клетках Д2 рецепторы [95]. Этот эффект, по-видимому, являлся следствием индукции ДД эффективности возбуждения указанных клеток при активации Д2 рецепторов. С другой стороны, дофамин способствовал усилению активности выходных клеток ОЛ за счет воздействия на Д1 рецепторы [98]. Поскольку на выходных клетках ОЛ имеются и Д1, и Д2 рецепторы, у которых разное соотношение с дофамином, результирующий модулирующий эффект должен зависеть от его концентрации. Если дофамин воздействует на Д1 рецепторы и на основных клетках, и на интернейронах, активность основных клеток ОЛ должна зависеть от соотношения сил возбуждения и торможения (см. [96]).

Следует отметить, что в синапсах, образованных аксонами нейронов ОЛ в пПК индуцируются только кратковременные формы синаптической пластичности, а ДП индуцируется за счет дополнительной активации входов в ПК из ОфК [19]. Стимуляция ОфК способствовала индукции в ПК ДП, длящейся более 4 часов [99]. Поэтому, в анализируемую обонятельную сеть включена также нейронная цепь, содержащая ОфК и МДЯ (рис. 2). Имеются данные о том, что связанная с МДЯ орбитальная кора проецируется в ПЯ, нейроны которого иннервируют дорсомедиальную область ЧВр [100]. Как уже указывалось, экспериментально показано влияние ОБ через ВП на активность нейронов МДЯ [83]. По-видимому, оно реализуется через вентролатеральную часть ВП (рис. 2). Из предлагаемого механизма следует, что при выделении дофамина в ОБ и ПЯ в ответ на подкрепляемый запах активность нейронов МДЯ должна увеличиться в результате ослабления их ингиби-

рования со стороны ВП. Вследствие этого должна увеличиться активность клеток-мишеней МДЯ в ОфК, которая возбуждает нейроны ПК. В свою очередь, это будет способствовать усилению возбуждения нейронов ПК со стороны ОфК, проецирующихся в ПК. Как указано выше, это облегчит индукцию ДП на входах из ОЛ в ПК, что должно способствовать запоминанию отображений запахов на нейронах ПК. Как отмечено нами ранее, в обработке и восприятии слуховой и зрительной информации существенную роль играет цепь К—БГ—Т—К, включающая ПФК [6]. Поэтому, вовлечение цепей, включающих фронтальные области коры в обработку запахов (рис. 2), дополнительно указывает на сходство механизмов обработки обонятельной информации и других видов сенсорной информации.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ПРЕДПОЛАГАЕМОГО ХАРАКТЕРА ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ В ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СЕТИ ПРИ ОБУЧЕНИИ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО НАБЛЮДАЕМЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

Согласно предлагаемому механизму, дофамин, выделяющийся в ответ на подкрепление, должен способствовать увеличению активности тех нейронов ОЛ, ПОЯ и ПК, которые реагируют на подкрепляемый запах и ослаблением реакций на запах, который не подкрепляли. Этот эффект связан с растормаживанием со стороны ВП только тех клеток ОЛ, которые первоначально реагировали на условный запах. Такому же эффекту должны способствовать агонисты дофаминовых Д1 и Д2 рецепторов. Действительно, когда два запаха предъявляли в задании, в котором один из них поощряли, а другой нет, то популяция митральных/пучковых клеток ОЛ реагировала на два запаха по-разному, причем реакции на запах, который не подкрепляли, устойчиво снижались [101]. При обучении, в котором сигнальным стимулом являлся запах, менялась активность шипиковых нейронов ОБ, на которых располагались и Д1, и Д2 рецепторы [55, 102, 103]. Одновременное функционирование стрионигральных и стриопаллидарных клеток является важным условием предлагаемого механизма. Экспериментальные исследования продемонстрировали особенности вовлечения нейронов этих двух типов. При положительном подкреплении преимущественно активировались шипиковые клетки антеромедиальной части ОБ, на которых располагались Д1 рецепторы. Если запах ассоциировали с электрическим раздражением лапы, преимущественно активировались клетки антеромедиальной части ОБ, на которых располагались Д2 рецепторы, а также клетки латеральной части ОБ, на которых располагались Д1 рецепторы [103]. Эти данные могут быть связаны с существованием отдельных мезолимбических дофаминовых подсистем. Например, показано, что влияние дофаминергических клеток ВПП на активность нейронов разных участков вентральной

части ПЯ зависит от того, являлся ли безусловный стимул положительным или аверзивным [104]. Не исключено, что при негативном подкреплении уровень дофамина в ОБ был низким и Д2 рецепторы не активировались, поскольку их сродство с дофамином меньше, чем у Д1 рецепторов [105]. В таком случае на возбуждающих входах к стриопаллидарным клеткам не индуцировалась ДД, что и отразилось в их преимущественной активации, наблюдавшейся в работе [103].

На мышах показано, что нейроны ОБ и с Д1, и с Д2 рецепторами реагируют как на запахи, сигнализирующие положительное подкрепление, так и на запахи, ассоциируемые с аверзивным стимулом [106]. При этом в активности нейронов с Д1 рецепторами хорошо отображалась значимость запаха. Они сходным образом отвечали на условные запахи, за которыми следовало сходное действие, независимо от типа запаха. По контрасту, отображение запахов нейронами с Д2 рецепторами слабее зависело от последующего результата, и эти нейроны были более избирательны к типу запаха, чем к его значимости [106]. Эти данные указывают на разную функциональную роль прямого и непрямого пути через ОБ. Это может быть связано с разным числом стрионигральных и стриопаллидарных клеток в ОБ [59], а также с различной организацией локальных цепей, в которые они включены.

Имеются экспериментальные данные об участии нейронов ПК в определении типа и интенсивности запаха [107, 108]. При обучении нейроны ПК реагируют на предпочтительный запах, участвуют в запоминании запаха, связанного с опасностью, а также в обработке информации об объектах, связанных с запахом [109–111]. Согласно предлагаемому механизму, при обучении должна усилиться активность тех групп пирамидных нейронов ПК, чьи рецептивные поля настроены на подкрепляемый запах, поскольку увеличивается их возбуждение со стороны ОЛ и ОфК, что должно способствовать индукции ДП на их возбуждающих входах. Действительно, ДП в обонятельном пути в ПК наблюдали именно при ассоциации запаха с подкреплением, тогда как при псевдообусловливании ДП не индуцировалась [112]. На крысах показано, что НМДА-зависимое усиление эффективности синаптической передачи в ПК положительно коррелирует с улучшением обучения [113].

Примечательно, что ассоциации запах–вознаграждение отображаются в активности нейронов зПК и ОБ сходным образом [102]. Оказалось, что по мере продвижения сигналов от ОЛ к ПК отображения запахов в активности пирамидных нейронов зависят от характера задачи только в зПК, но не в пПК [101]. По-видимому, это связано с разной организацией проекций в зПК и пПК. В частности, показано, что в зПК поступает более сильная иннервация из базолатеральной миндалины, так что избирательные к запахам популяции нейронов зПК разряжались различным образом в зависимости от значимости запаха [35]. Во

время ассоциативного обучения в пПК крыс также обнаружена значительная пластичность ответов нейронов на запахи. Дискриминация и категоризация запахов в пПК поддерживаются нисходящим влиянием на ПК со стороны ОфК [99]. Полагают, что в пПК лучше отображаются свойства запаха, а в зПК — значимость запаха [15]. Из предлагаемого механизма следует, что ослабление ингибирования МДЯ со стороны выходных ядер БГ должно способствовать усилению его активности и активности его клеток-мишеней в ПК и ОфК. Однако поскольку ПК и ОфК вовлечены в разные цепи, характер усиления их активности может быть различным. Оказалось, что связь МДЯ и ПК особенно сильно увеличивается при распознавании запаха, а во время принятия решения о том, к какому запаху приблизиться, увеличивается связь МДЯ с ОфК [114].

Из предлагаемого механизма следует также, что повреждение каждого из звеньев в обонятельной цепи, включающей ОЛ, ПОЯ, ПК, ОБ и ВП, а также связанных с ними МДЯ, ПфК и ОфК, должно препятствовать формированию нейронных отображений запахов и ухудшению их восприятия. Действительно, в проведенных на крысах экспериментах, в которых инактивировали разные структуры, показано, что в выполнении задач на различение запахов участвует обонятельная нейронная сеть, а также соответствующие области таламуса и ПфК, включая ОфК [115]. У человека повреждение таламуса практически не влияло на обнаружение запаха, но существенно нарушало возможность его идентификации [116]. Результаты этого эксперимента указывают на существенный вклад в идентификацию запахов связей МДЯ с фронтальными областями коры, а также на то, что для обнаружения запаха достаточно связи оставшейся интактной ОЛ с ПК.

В согласии с предлагаемым механизмом показано, что обработка информации о запахе чувствительна к концентрации выделяемого дофамина. У пациентов с болезнью Паркинсона, в основе которой лежит гибель дофаминергических клеток ЧВк, гипосмия наблюдается в 80–90% случаев [117]. При этом ухудшение обнаружения и дискриминации запахов коррелирует с тяжестью заболевания [118]. На модели болезни Паркинсона у мышей также продемонстрировано ухудшение дискриминации подкрепляемого запаха. Полагают, что это связано с дофаминергической денервацией ОБ и ПЯ [117]. Ухудшение обоняния при болезни Паркинсона свидетельствует в пользу того, что в обработке обонятельной информации принимает участие дофаминергическая иннервация ОБ не только из ВПП, но и из ЧВк. Примечательно, что при болезни Паркинсона снижение обонятельной чувствительности наблюдается еще до появления заметных двигательных нарушений [4]. Из этого следует, что характер функционирования обонятельных цепей более чувствителен к дефициту дофамина, чем характер функционирования моторной цепи К–БГ–Т–К.

Из предлагаемого механизма следует, что улучшению обнаружения и дискриминации запахов могут способствовать антагонисты аденозиновых рецепторов, причем предпочтительно использовать антагонисты A2A рецепторов, плотность которых в ОБ высока. Действительно, на крысах показано, что распознавание запахов значительно улучшал неспецифический антагонист аденозиновых рецепторов кофеин, а также избирательный антагонист A2A рецепторов, но не A1 рецепторов [119]. Антагонисты A2A рецепторов улучшают обоняние и при старении [120]. Более того, антагонисты A2A рецепторов улучшали обоняние у пациентов с болезнью Паркинсона в тех случаях, когда дофаминергические препараты не оказывали заметного влияния [121]. При этом они не вызывали дискинезии, которую вызывает использование больших доз дофаминергических препаратов [122]. Наш предшествующий анализ [91] позволил объяснить, почему системное использование антагонистов A2A рецепторов может ослабить двигательные нарушения и при этом не приводить к побочным эффектам. Из вышеизложенного следует, что характер изменений активности нейронов в обонятельной сети при обучении, вытекающий из предлагаемого механизма обработки обонятельной информации, согласуется с известными экспериментальными данными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что БГ являются очень древней структурой. Сравнение функциональных характеристик БГ древнейшей группы ныне живущих позвоночных миног и БГ млекопитающих показало практическую идентичность их общей организации, межнейронных связей, набора нейротрансмиттеров и их рецепторов, нейропептидов и экспрессии ионных каналов [123, 124]. Средний мозг также устроен практически одинаково у миног и грызунов [123]. Дорсальный паллиум (кора) миноги имеет ретинотопическую зрительную область, соматосенсорную и моторную области, а вентральная часть паллиума содержит обонятельную область, похожую на ПК [124]. Как и в ПК млекопитающих, в вентральной части паллиума миноги три слоя, а дендритные ветви нейронов имеют шипики и охватывают все слои [125]. У миноги обонятельная кора имеет вход из ОЛ и активируется с небольшим латентным периодом при стимуляции обонятельного нерва [124]. Прimitивная трехслойная ПК не организована топографически, но ее ассоциативная природа способствует синтетической обработке информации, в отличие от аналитической обработки отдельных признаков сложных сигналов, характерной для классических иерархических топографически организованных цепей в новой коре [126].

Мы полагаем, что предлагаемый в настоящей работе механизм обработки обонятельной информации аналогичен у позвоночных, находящихся на разных стадиях эволюции, включая такие древние, как миноги, вследствие схождения

функциональной организации БГ в этих стадиях. В отсутствие неокортекса контрастное отображение запахов может формироваться на нейронах ОЛ за счет выделения дофамина в ОБ, длительной модификации эффективности возбуждающих входов от ОЛ к шипиковым нейронам ОБ и последующего растормаживания нейронов ОЛ со стороны ВП. Полагают, что сильные долго длящиеся ассоциации подкрепления с запахом являются следствием выделения дофамина в ОБ, куда поступает возбуждение из ОЛ [106]. С точки зрения предлагаемого механизма, в основе этого эффекта лежат длительные дофамин-зависимые перестройки эффективности возбуждающих входов в ОБ из ОЛ и ПК и последующая перестройка активности нейронов во всей обонятельной сети.

Существует мнение, что деление таламических ядер на ядра первого и высших порядков устарело. Необходима классификация, основанная на том, что структура таламо-кортикальных взаимодействий естественным образом определяет их функцию [48]. С учетом такой классификации, ОЛ выполняет ту же роль, что и таламус [9]. Мы полагаем, что функционирование ОЛ, как и функционирование разных ядер таламуса, зависит от их взаимодействий не только с корой, но и с БГ. Ранее предполагали, что МДЯ является первичной областью представления запахов в таламусе [127], но в настоящее время его относят к ядрам высокого порядка, тогда как первичной областью отображения запахов является ОЛ. В предлагаемом механизме МДЯ также играет роль таламического ядра высокого порядка, поскольку оно получает информацию из ПК [75] и может переносить ее в ОфК и ПфК, тогда как проекций из МДЯ в ПК не обнаружено [128].

Хотя одни экспериментальные данные указывают только на релейные сенсорные свойства нейронов ОЛ, другие данные подчеркивают способность этих нейронов интегрировать поступающую обонятельную информацию с мотивацией, вниманием и предыдущим опытом [129]. С точки зрения предлагаемого механизма, способность нейронов ОЛ к интеграции обусловлена, с одной стороны, с входами в нее из ПК, связанной с ОфК, а с другой стороны, с влиянием на ОЛ со стороны ВП, чья активность зависит от конвергирующих на ОБ входах из ПК, ОфК, миндалины и гиппокампа. В работе [130] идентичность запаха и его значимость также связали не только с периферическими, но и с нисходящими входами в ОЛ. При этом предположено, что нисходящие входы в ОБ потенциально представляют разные значения запаха. Примечательно, что повреждение ОЛ приводило к патологии лобной коры, поразительно сходной с изменениями в этой области коры у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями [131]. Дисфункция обонятельных областей коры характерна для таких неврологических заболеваний, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутизм [32]. В частности, дисфункцию ПК наблюдали при гипосмии у пациентов с болезнью

Паркинсона [132]. При болезни Альцгеймера атрофируется путь от ПК к энторинальной коре [133].

Имеются данные о том, что обоняние можно усилить с помощью дофамина. Например, к улучшению обонятельной чувствительности приводило использование в течение двух месяцев ментилфенидата, который увеличивает концентрацию дофамина в мозге [134]. Распознавание и дискриминацию запахов улучшала также активация D1 рецепторов [98]. Однако по другим данным, дофаминовые препараты оказывают слабое влияние на обонятельный дефицит при болезни Паркинсона [135]. С нашей точки зрения, отсутствие улучшения обоняния при системном введении дофамина могло быть вызвано тем обстоятельством, что на обоняние влияет и дегенерация дофаминергических нейронов в ОЛ, хотя они не так подвержены гибели, как клетки ЧВк [136]. Примечательно, что при моделировании болезни Паркинсона число дофаминергических клеток уменьшалось и в ЧВк, и в ОЛ, но использование L-DOPA увеличивало их число в ОЛ [137]. Однако неизвестно, достаточно ли этого увеличения для нормализации концентрации дофамина в ОЛ. Как указано выше, с точки зрения предлагаемого механизма, действие дофамина на активность нейронов ОЛ существенно зависит от его концентрации. Поскольку при системном введении дофаминергических препаратов их влияние на обоняние зависит от многих факторов, подбор необходимой дозы, по-видимому, затруднен, а чрезмерное ее увеличение приводит к побочным эффектам.

Длительное нарушение обоняния является распространенным последствием черепно-мозговых травм. У некоторых пациентов тренировки в течение 24 недель после травмы приводили к улучшению идентификации запаха и восприятия его интенсивности [138]. Однако тренировки помогали лишь небольшой группе пациентов с болезнью Паркинсона [139]. По-видимому, тренировки не всегда могут компенсировать те изменения межнейронных взаимодействий в обонятельной сети, которые были вызваны дефицитом дофамина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость иметь хорошее обоняние вызвана его участием в таких жизненно важных функциях, как предупреждение и защита от опасностей окружающей среды, пищевое поведение, а также социальное общение [140]. Опасным для жизни может быть, например, невозможность обнаружить запах дыма или испорченных продуктов [141]. Судя по известным данным, хроническая потеря обоняния (аносмия) или искаженное восприятие запахов (паросмия) наблюдаются у 1.4% американцев [142], а по данным работы [143] anosмией в целом страдают около 5% населения. Обонятельная дисфункция сильно коррелирует с нейродегенерацией [131]. Например, у пациентов с болезнью Паркинсона ухудшение обоняния наблюдается в 95% случаев [136].

С начала пандемии COVID-19 описано множество случаев внезапной потери обоняния, причем anosмия часто является первым, а иногда и единственным признаком заболевания у бессимптомных носителей вируса [144]. В течение первой недели после заболевания COVID-19 паросмия, приводящая к снижению качества жизни, появлялась у 25.4% респондентов, а после первого месяца — у 43.4% [145]. Хотя anosмию при инфекции коронавирусом связывают с нарушением обонятельного эпителия и ослаблением нейрогенеза в ОЛ, но она может быть связана также с потерей дофаминергических клеток и изменением функционирования всей дофаминергической системы [146]. С нарушением этой системы связывают и появление двигательных нарушений при COVID-19 [147]. По-видимому, COVID-19 приводит к потере дофаминергических клеток и в ОЛ, и в ЧВк, поскольку у пациентов с COVID-19 двигательные нарушения наблюдали даже если у них не было болезни Паркинсона [148].

Показано, что при инфицировании коронавирусом из поврежденных клеток высвобождается большое количество аденозинтрифосфата, который способствует развитию воспалительного процесса [149]. Авторы указанной работы выдвинули гипотезу о том, что использование антагонистов A2A рецепторов может быть полезным для лечения COVID-19 за счет повышения эффективности врожденной и адаптивной иммунной системы. Из предлагаемого нами механизма следует, что повышение концентрации аденозина в мозге при инфицировании коронавирусом должно привести к ухудшению обоняния за счет воздействия на A2A рецепторы на нейронах ОБ, и к двигательным нарушениям за счет воздействия на A2A рецепторы на нейронах дорзальной моторной части стриатума. В таком случае использование антагонистов A2A рецепторов при лечении пациентов с COVID-19 должно не только улучшить обоняние, но и ослабить двигательные нарушения. Понимание механизмов функционирования обонятельной нейронной сети, чему посвящена настоящая работа, может быть полезным для поиска методов улучшения обоняния при различных заболеваниях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fletcher M.L., Chen W.R. // Learn. Mem. 2010. V. 17. № 11. P. 561–570.
2. Newman R., Winans S.S. // J. Comp. Neurol. 1980. V. 191. № 2. P. 193–212.
3. Wamsley J.K., Gehlert D.R., Filloux F.M., Dawson T.M. // J. Chem. Neuroanat. 1989. V. 2. № 3. P. 119–137.

4. Zhang W., Sun C., Shao Y., Zhou Z., Hou Y., Li A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 254.
5. Zhang Z., Wei S., Du H., Su Z., Wen Y., Shang Z., Song X., Xu Z., You Y., Yang Z. // *Exp. Neurol.* 2019. V. 322. P. 113055.
6. Силькис И.Г. // *Успехи физиол. наук* 2015. Т. 46. № 3. С. 76–92.
7. Silkis I. // *Biosystems*, 2007. V. 89. № 1–3. P. 227–235.
8. Силькис И.Г. // *Нейрохимия*. 2013. Т. 30. № 4. С. 305–313.
9. Kay L.M., Sherman S.M. // *Trends Neurosci.* 2007. V. 30. № 2. P. 47–53.
10. Savic I. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002. V. 12. № 4. P. 455–461.
11. Takeuchi H., Sakano H. // *Cell Mol. Life Sci.* 2014. V. 71. № 16. P. 3049–3057.
12. Mori K., Takahashi Y.K., Igarashi K.M., Yamaguchi M. // *Physiol Rev.* 2006. V. 86. № 2. P. 409–433.
13. Wachowiak M., Shipley M.T. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2006. V. 17. № 4. P. 411–423.
14. Mori K., Sakano H. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2011. V. 34. P. 467–499.
15. Wilson D.A. // *Chem. Senses.* 2001. V. 26. № 5. P. 577–584.
16. Chu M.W., Li W.L., Komiyama T. // *Neuron.* 2016. V. 92. № 1. P. 174–186.
17. Mandairon N., Stack C., Kiselycznyk C., Linster C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 36. P. 13543–13548.
18. Isaacson J.S. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2010. V. 20. № 3. P. 328–331.
19. Strauch C., Hoang T.H., Angenstein F., Manahan-Vaughan D. // *Cereb. Cortex.* 2022. V. 32. № 4. P. 689–708.
20. Tsuji T., Tsuji C., Lozic M., Ludwig M., Leng G. // *Physiol. Rep.* 2019. V. 7. № 22. P. e14284.
21. Kay R.B., Meyer E.A., Illig K.R., Brunjes P.C. // *J. Comp. Neurol.* 2011. V. 519. № 2. P. 277–289.
22. McGinley M.J., Westbrook G.L. // *J. Neurophysiol.* 2011. V. 105. № 4. P. 1444–1453.
23. Russo M.J., Franks K.M., Oghaz R., Axel R., Siegelbaum S.A. // *J. Neurosci.* 2020. V. 40. № 49. P. 9414–9425.
24. Tantrigama M.L.S., Huang H.H.-Y., Bekkers J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 9. P. 2407–2412.
25. Brunjes P.C. // *Chem. Senses.* 2021. V. 46. P. bjab002.
26. Illig K.R., Haberly L.B. // *J. Comp. Neurol.* 2003. V. 457. № 4. P. 361–373.
27. Suzuki N., Bekkers J.M. // *J. Comp. Neurol.* 2010. V. 518. № 10. P. 1670–1687.
28. Franks K.M., Russo M.J., Sosulski D.L., Mulligan A.A., Siegelbaum S.A., Axel R. // *Neuron.* 2011. V. 72. № 1. P. 49–56.
29. Mori K., Sakano H. // *Annu. Rev. Physiol.* 2021. V. 83. P. 231–256.
30. Stettler D.D., Axel R. // *Neuron.* 2009. V. 63. № 6. P. 854–864.
31. Cavada C., Compañy T., Tejedor J., Cruz-Rizzolo R.J., Reinoso-Suárez F. // *Cereb. Cortex.* 2000. V. 10. № 3. P. 220–242.
32. Wilson D.A., Xu W., Sadrian B., Courtiol E., Cohen Y., Barnes D.C. // *Prog. Brain Res.* 2014. V. 208. P. 275–305.
33. Chen C.F., Zou D.-J., Altomare C.G., Xu L., Greer C.A., Firestein S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 47. P. 16931–16936.
34. Münster A., Votteler A., Sommer S., Hauber W. // *Cereb. Cortex Commun.* 2020. V. 1. № 1. P. tgaa086.
35. Calu D.J., Roesch M.R., Stalnaker T.A., Schoenbaum G. // *Cereb. Cortex.* 2007. V. 17. № 6. P. 1342–1349.
36. Courtiol E., Wilson D.A. // *Perception.* 2017. V. 46. № 3–4. P. 320–332.
37. Zhou G., Lane G., Cooper S.L., Kahnt T., Zelano C. // *Elife.* 2019. V. 8. P. e47177.
38. Watanabe K., Kawana E. // *Brain Res.* 1984. V. 296. № 1. P. 148–151.
39. Padmanabhan K., Osakada F., Tarabrina A., Kizer E., Callaway E.M., Gage F.H., Sejnowski T.J. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 28. P. 7535–7545.
40. Boyd A.M., Kato H.K., Komiyama T., Isaacson J.S. // *Cell Rep.* 2015. V. 10. № 7. P. 1032–1039.
41. Zhou F.W., Puche A.C., Shipley M.T. // *Front. Cell Neurosci.* 2018. V. 12. P. 387.
42. Burton S.D. // *J. Neurophysiol.* 2017. V. 118. № 4. P. 2034–2051.
43. Vaaga C.E., Yorgason J.T., Williams J.T., Westbrook G.L. // *J. Neurophysiol.* 2017. V. 117. № 3. P. 1163–1170.
44. Sarnat H.B., Flores-Sarnat L. // *Handb. Clin. Neurol.* 2019. V. 164. P. 29–45.
45. Iravani B., Arshamian A., Ohla K., Wilson D.A., Lundström J.N. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 648.
46. Jones E.G. // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. № 10. P. 595–601.
47. Sosulski D.L., Bloom M.L., Cutforth T., Axel R., Data S.R. // *Nature.* 2011. V. 472. № 7342. P. 213–216.
48. Halassa M.M., Sherman S.M. // *Neuron.* 2019. V. 103. № 5. P. 762–770.
49. Unzai T., Kuramoto E., Kaneko T., Fujiyama F. // *Cereb. Cortex.* 2017. V. 27. № 2. P. 1164–1181.
50. Ikemoto S. // *Brain Res. Rev.* 2007. V. 56. № 1. P. 27–78.
51. Murata K. // *Front. Neural Circuits.* 2020. V. 14. P. 577880.
52. Suarez-Roca H., Lovenberg T., Cubeddu L.X. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987. V. 243. № 3. P. 840–851.
53. Graybiel A.M., Ohta K., Roffler-Tarlov S. // *J. Neurosci.* 1990. V. 10. № 3. P. 720–733.
54. Schmidt M.J., Sawyer B.D., Perry K.W., Fuller R.W., Foreman M.M., Ghetti B. // *J. Neurosci.* 1982. V. 2. № 3. P. 376–380.
55. Murata K., Kanno M., Ieki N., Mori K., Yamaguchi M. // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 29. P. 10581–10599.
56. Soares-Cunha C., Coimbra B., Sousa N., Rodrigues A.J. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016. V. 68. P. 370–386.
57. Levey A.I., Hersch S.M., Rye D.B., Sunahara R.K., Niznik H.B., Kitt C.A., Price D.L., Maggio R., Brann M.R., Ciliax B.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 19. P. 8861–8865.
58. Le Moine C., Bloch B. // *J. Comp. Neurol.* 1995. V. 355. № 3. P. 418–426.
59. Furuta T., Zhou L., Kaneko T. // *Neuroscience.* 2002. V. 114. № 3. P. 611–627.
60. Altar C.A., Hauser K. // *Brain Res.* 1987. V. 410. № 1. P. 1–11.
61. Haber S.N., Nauta W.J. // *Neuroscience.* 1983. V. 9. № 2. P. 245–260.
62. Heimer L., Zaborszky L., Zahm D.S., Alheid G.F. // *J. Comp. Neurol.* 1987. V. 255. № 4. P. 571–591.
63. Xiong A., Wesson D.W. // *Chem. Senses.* 2016. V. 41. № 7. P. 549–555.
64. Pardo-Garcia T.R., Garcia-Keller C., Penaloza T., Richie C.T., Pickel J., Hope B.T., Harvey B.K., Kali-

- vas P.W., Heinsbroek J.A. // J. Neurosci. 2019. V. 39. № 11. P. 2041–2051.
65. Cansler H.L., Wright K.N., Stetzk L.A., Wesson D.W. // J. Neurochem. 2020. V. 152. № 4. P. 425–448.
 66. Carlson K.S., Dillione M.R., Wesson D.W. // J. Neurophysiol. 2014. V. 111. № 10. P. 2109–2123.
 67. Scott J.W., McBride R.L., Schneider S.P. // J. Comp. Neurol. 1980. V. 194. № 3. P. 519–534.
 68. Wahle P., Meyer G. // Exp. Brain Res. 1986. V. 62. № 3. P. 528–540.
 69. Schwob J.E., Price J.L. // J. Comp. Neurol. 1984. V. 223. № 2. P. 203–222.
 70. White K.A., Zhang Y.F., Zhang Z., Bhattarai J.P., Moberly A.H., In't Zandt E.E., Pena-Bravo J.I., Mi H., Jia X., Fuccillo M.V., Xu F., Ma M., Wesson D.W. // J. Neurosci. 2019. V. 39. № 48. P. 9546–9559.
 71. Giessel A.J., Datta S.R. // Curr. Opin. Neurobiol. 2014. V. 24. № 1. P. 120–132.
 72. Payton C.A., Wilson D.A., Wesson D.W. // PLoS One. 2012. V. 7. № 4. P. e34926.
 73. Derman C.R., Barbas H. // J. Comp. Neurol. 1994. V. 344. № 4. P. 508–531.
 74. Morecraft R.J., Geula C., Mesulam M.M. // J. Comp. Neurol. 1992. V. 323. № 3. P. 341–358.
 75. Ray J.P., Price J.L. // J. Comp. Neurol. 1992. V. 323. № 2. P. 167–197.
 76. Cansler H.L., In't Zandt E.E., Carlson K.S., Khan W.T., Ma M., Wesson D.W. // Cereb. Cortex. 2022. bhac153. Online ahead of print.
 77. Takagishi M., Chiba T. // Brain Res. 1991. V. 566. № 1–2. P. 26–39.
 78. Berendse H.W., Galis-de Graaf Y., Groenewegen H.J. // J. Comp. Neurol. 1992. V. 316. № 3. P. 314–347.
 79. Groenewegen H.J., Berendse H.W., Haber S.N. // Neuroscience. 1993. V. 57. № 1. P. 113–142.
 80. Maurice N., Deniau J.M., Menetrey A., Glowinski J., Thierry A.M. // Neuroscience. 1997. V. 80. № 2. P. 523–534.
 81. Root D.H., Melendez R.I., Zaborszky L., Napier T.C. // Prog. Neurobiol. 2015. V. 130. P. 29–70.
 82. Gulcebi M.I., Ketenci S., Linke R., Hacıoğlu H., Yanali H., Veliskova J., Moshé S.L., Onat F., Çavdar S. // Brain Res. Bull. 2012. V. 87. № 2–3. P. 312–318.
 83. Zahm D.S., Zaborszky L., Alheid G.F., Heimer L. // J. Comp. Neurol. 1987. V. 255. № 4. P. 592–605.
 84. Araki T., Kato M., Kobayashi T. // Brain Res. 1995. V. 693. № 1–2. P. 207–216.
 85. Silkis I. // Biosystems. 2001. V. 59. № 1. P. 7–14.
 86. Zaborszky L., Carlsen J., Brashear H.R., Heimer L. // J. Comp. Neurol. 1986. V. 243. № 4. P. 488–509.
 87. Lévy F., Meurisse M., Ferreira G., Thibault J., Tillet Y. // J. Chem. Neuroanat. 1999. V. 16. № 4. P. 245–2263.
 88. DeMet E.M., Chiczy-DeMet A. // Arch. Pharmacol. 2002. V. 366. № 5. P. 478–481.
 89. Rosin D.L., Hettinger B.D., Lee A., Linden J. // Neurology. 2003. V. 61. № 11. (Suppl 6). P. S12–S18.
 90. Li R., Wang Y.Q., Liu W.Y., Zhang M.Q., Li L., Cherasse Y., Schiffmann S.N., de Kerchove d'Exaerde A., Lazarus M., Qu W.M., Huang Z.L. // Neuropharmacology. 2020. V. 168. P. 107923.
 91. Силькис И.Г. // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 4. С. 287–299.
 92. Ballesteros-Yáñez I., Castillo C.A., Merighi S., Gessi S. // Front. Pharmacol. 2018. V. 8. P. 985.
 93. Kruzich P.J., Grandy D.K. // BMC Neurosci. 2004. V. 5. P. 12.
 94. Wilson D.A., Sullivan R.M. // J. Neurosci. 1995. V. 15. № 8. P. 5574–5581.
 95. Brünig I., Sommer M., Hatt H., Bormann J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 5. P. 2456–2460.
 96. Силькис И.Г. // Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 2002. Т. 52. № 4. С. 392–405.
 97. Silkis I.G. // Biosystems. 1998. V. 48. № 1–3. P. 205–213.
 98. Liu S. // Front. Cell Neurosci. 2020. V. 14. P. 172.
 99. Strauch C., Manahan-Vaughan D. // Cereb. Cortex. 2018. V. 28. № 2. P. 764–776.
 100. Montaron M.F., Deniau J.M., Menetrey A., Glowinski J., Thierry A.M. // Neuroscience. 1996. V. 71. № 2. P. 371–382.
 101. Wang D., Liu P., Mao X., Zhou Z., Cao T., Xu J., Sun C., Li A. // J. Neurosci. 2019. V. 39. № 50. P. 10002–10018.
 102. Gadziola M.A., Stetzk L.A., Wright K.N., Milton A.J., Arakawa K., Del Mar Cortijo M., Wesson D.W. // Cell Rep. 2020. V. 32. № 3. P. 107919.
 103. Murata K., Kinoshita T., Fukazawa Y., Kobayashi K., Yamanaka A., Hikida T., Manabe H., Yamaguchi M. // Front. Behav. Neurosci. 2019. V. 13. P. 50.
 104. de Jong J.W., Affei S.A., Dorocic I.P., Peck J.R., Liu C., Kim C.K., Tian L., Deisseroth K., Lammel S. // Neuron. 2019. V. 101. № 1. P. 133–151. e7.
 105. Xu T.X., Ma Q., Spealman R.D., Yao W.D. // J. Neurochem. 2010. V. 115. № 6. P. 1643–1654.
 106. Martiros N., Kapoor V., Kim S.E., Murthy V.N. // Elife. 2022. V. 11. P. e75463.
 107. Bolding K.A., Franks K.M. // Elife. 2017. V. 6. P. e22630.
 108. Jiang H., Schuele S., Rosenow J., Zelano C., Parvizi J., Tao J.X., Wu S., Gottfried J.A. // Neuron. 2017. V. 94. № 1. P. 207–219. e4.
 109. Meissner-Bernard C., Dembitskaya Y., Venance L., Fleischmann A. // Curr. Biol. 2019. V. 29. № 3. P. 367–380. e4.
 110. Schaffer E.S., Stettler D.D., Kato D., Choi G.B., Axel R., Abbott L.F. // Neuron. 2018. V. 98. № 4. P. 736–742. e3.
 111. Wilson D.A., Sullivan R.M. // Neuron. 2011. V. 72. № 4. P. 506–519.
 112. Chaillan F.A., Roman F.S., Soumireu-Mourat B. // J. Physiol. Paris. 1996. V. 90. № 5–6. P. 343–347.
 113. Barkai E., Saar D. // Rev. Neurosci. 2001. V. 12. № 2. P. 111–120.
 114. Courtiol E., Wilson D.A. // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 22. P. 5946–5960.
 115. Ferry A.T., Lu X.C., Price J.L. // Exp. Brain Res. 2000. V. 131. № 3. P. 320–335.
 116. Sela L., Sacher Y., Serfaty C., Yeshurun Y., Soroker N., Sobel N. // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 39. P. 12059–12069.
 117. Valle-Leija P., Drucker-Colín R. // Neuroreport. 2014. V. 25. № 12. P. 948–953.
 118. Tissingh G., Berendse H.W., Bergmans P., DeWaard R., Drukarch B., Stoof J.C., Wolters E.C. // Mov. Disord. 2001. V. 16. № 1. P. 41–46.
 119. Prediger R.D., Batista L.C., Takahashi R.N. // Neurobiol. Aging. 2005. V. 26. № 6. P. 957–964.
 120. Sun X., Li L., Zhang H.Y., He W., Wang D.R., Huang Z.L., Wang Y.Q. // Brain Res. 2021. V. 1768. P. 147590.
 121. Prediger R.D. // J. Alzheimers Dis. 2010. V. 20. Suppl 1. P. S205–S220.
 122. Jenner P. // Neurology. 2003. V. 61. № 11. (Suppl 6). P. S32–S38.
 123. Grillner S. // Curr. Opin. Neurobiol. 2021. V. 71. P. 11–18.

124. Suryanarayana S.M., Pérez-Fernández J., Robertson B., Grillner S. // Brain Behav. Evol. 2022. V. 96. № 4–6. P. 318–333.
125. Suryanarayana S.M., Robertson B., Wallén P., Grillner S. // Curr. Biol. 2017. V. 27. № 21. P. 3264–3277.e5
126. Wilson D.A., Rennaker R.L. // In: Menini A, editor. The Neurobiology of Olfaction. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 14. Frontiers in Neuroscience.
127. Price J.L., Slotnick B.M. // J. Comp. Neurol. 1983. V. 215. № 1. P. 63–77.
128. Motokizawa F., Yasuda N., Shimomura F. // Neurosci. Lett. 1988. V. 84. № 1. P. 41–55.
129. Gervais R., Buonviso N., Martin C., Ravel N. // J. Physiol. Paris. 2007. V. 101. № 1–3. P. 40–45.
130. Yamaguchi M. // Front. Neuroanat. 2017. V. 11. P. 33.
131. Bhatia-Dey N., Heinbockel T. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2021. V. 18. № 13. P. 6976.
132. Baba T., Takeda A., Kikuchi A., Nishio Y., Hosokai Y., Hirayama K., Hasegawa T., Sugeno N., Suzuki K., Mori E., Takahashi S., Fukuda H., Itoyama Y. // Mov. Disord. 2011. V. 26. № 4. P. 621–628.
133. Daulatzai M.A. // J. Neural Transm. (Vienna). 2015. V. 122. № 10. P. 1475–1497.
134. El Amine F., Heidinger B., Cameron J.D., Hafizi K., BaniFatemi S., Robaey P., Vaillancourt R., Goldfield G.S., Doucet É. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2022. V. 100. № 5. P. 432–440.
135. Bang Y., Lim J., Choi H.J. // Arch. Pharm. Res. 2021. V. 44. № 6. P. 588–604.
136. Pas T., Asfalq M., Tolve M., Blaess S., Rothermel M., Wiesner R.J., Ricke K.M. // Mol. Neurobiol. 2020. V. 57. № 9. P. 3646–3657.
137. Chiu W.H., Carlsson T., Depboylu C., Höglinger G.U., Oertel W.H., Ries V. // Neuropharmacology. 2014. V. 79. P. 212–221.
138. Pellegrino R., Han P., Reither N., Hummel T. // Laryngoscope. 2019. V. 129. № 8. P. 1737–1743.
139. Knudsen K., Flensburg Damholdt M., Mouridsen K., Borghammer P. // Acta Neurol. Scand. 2015. V. 132. № 6. P. 395–400.
140. Boesveldt S., Parma V. // Cell Tissue Res. 2021. V. 383. № 1. P. 559–567.
141. White T.L., Sadikot A.F., Djordjevic J. // Brain Cogn. 2016. V. 104. P. 1–6.
142. Scangas G.A., Bleier B.S. // Am. J. Rhinol. Allergy. 2017. V. 31. № 1. P. 3–7.
143. Hüttenbrink K.B., Hummel T., Berg D., Gasser T., Hähner A. // Dtsch. Arztebl. Int. 2013. V. 110. № 1–2. P. 1–7. e1.
144. Ahmed A.K., Sayad. R., Mahmoud I.A., El-Monem A.M.A., Badry S.H., Ibrahim I.H., Hafez M.H., El-Mokhtar M.A., Sayed I.M. // J. Neurovirol. 2022. V. 28. № 2. P. 189–200.
145. Lerner D.K., Garvey K.L., Arrighi-Allisan A.E., Filimonov A., Filip P., Shah J., Tweel B., Del Signore A., Schaberg M., Colley P., Govindaraj S., Ilorreta A.M. // Laryngoscope. 2022. V. 132. № 3. P. 633–639.
146. Rethinavel H.S., Ravichandran S., Radhakrishnan R.K., Kandasamy M. // J. Chem. Neuroanat. 2021. V. 115. P. 101965.
147. Ghosh R., Biswas U., Roy D., Pandit A., Lahiri D., Ray B.K., Benito-León J. // Mov. Disord. Clin. Pract. 2021. V. 8. № 5. P. 669–680.
148. Salari M., Harofteh B.Z., Etemadifar M., Sedaghat N., Nouri H. // Parkinsons Dis. 2021. V. 2021. P. 3227753.
149. Abouelkhair M.A. // Med. Hypotheses. 2020. V. 144. P. 110012.

On the Similarity of the Mechanisms of Processing Olfactory, Auditory and Visual Information in the CNS (A Hypothesis)

I. G. Silkis

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

A possible mechanism for odors processing in a neural network that includes the olfactory bulb, the piriform cortex, the olfactory tubercle, which is the part of the ventral striatum, the ventral pallidum, the mediodorsal thalamic nucleus, and the orbitofrontal cortex, has been proposed. According to this mechanism, dopamine released by midbrain neurons in response to odor and reinforcement, as well as adenosine receptor antagonists, modulate in a certain way the efficacy of excitatory synaptic inputs to spiny cells of the olfactory tubercle projecting into the ventral pallidum. As a result, the neurons of the olfactory bulb are disinhibited by the ventral pallidum and contrasted odor representations are formed on them, as well as on their target cells in the piriform cortex. Simultaneously, there is a disinhibition of neurons of the mediodorsal nucleus and their target cells in the orbitofrontal cortex, which excites the neurons of the piriform cortex. This promotes the induction of LTP at the inputs from the olfactory bulb to the piriform cortex and the memorization of odor representations. For the first time it is pointed out that the mechanism for odor processing is similar to those we earlier proposed for processing of auditory and visual information in topographically organized cortico-basal ganglia-thalamocortical loops, which include the primary and higher areas of the auditory and visual cortex, as well as the prefrontal cortex. It is proposed that mechanism for olfactory processing is similar in vertebrates at different stages of evolution, including lampreys, due to the similarity of the functional organization of the basal ganglia and their interactions with other structures. It follows from the proposed mechanism that in cases when dopamine drugs are not effective in restoring the odor perception, it is desirable to use adenosine A2A receptor antagonists. Supporting this prediction is evidence of improved sense of smell in patients with COVID-19 when treated with A2A receptor antagonists.

Keywords: the olfactory bulb, the olfactory tubercle, the piriform cortex, basal ganglia, synaptic plasticity, dopamine

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 616.831–8-08:577.151.33:577.164.14

ЭФФЕКТ МОДУЛЯТОРОВ СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТА А НА ПРОЯВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА И СИСТЕМУ ГЛУТАТИОНА В ЦНС ПРИ АЛЮМИНИЕВОМ НЕЙРОТОКСИКОЗЕ

© 2023 г. Д. С. Семенович³, В. А. Гуринович¹, Е. П. Лукиенко¹, И. Н. Катковская¹, О. В. Титко¹, Н. П. Канунникова^{2,*}, А. Г. Мойсеёнок¹

¹ГУ “Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси”, Гродно, Беларусь

²Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.08.2022 г.

После доработки 04.08.2022 г.

Принята к публикации 09.08.2022 г.

У половозрелых крыс-самок линии Wistar CRL(WI) WUBR моделировали Alzheimer’s-Like Disease внутривенным введением хлорида алюминия в дозе 200 мг/кг массы тела на протяжении 6 недель. На фоне развившегося окислительного стресса (ОС) выявили падение активности ферментов ЦТК и возрастание дегидрогеназ ПФП, падение SH- и SS-групп белков с увеличением соотношения SH/SS и глутатионилирования с одновременным снижением глутатиона (GSH), соотношения GSH/GSSG и его редокс-потенциала. Ферменты системы глутатиона изменялись разнонаправленно при стабильности глутатионредуктазы. Отмечено падение активности ферментов биосинтеза GSH и содержания цистеина. Назначение с 5 недели эксперимента внутривенного введения модуляторов биосинтеза КоА D-пантенола (ПЛ), D-пантетина или D-гомопантотената (ГПК) в дозе 200 мг/кг приводило к ослаблению или нивелированию проявлений окислительного стресса в плазме крови, возрастанию активности ацетилхолинэстеразы, нормализации активности ферментов ЦТК и ПФП, уровня SH-групп (но не соотношения SH/SS) и значительному снижению процесса S-глутатионилирования, росту уровня GSH, соотношения GSH/GSSG и редокс-потенциала в больших полушариях мозга. Эффект модуляторов системы КоА проявился в активации глутатион-трансферазы, снижении глутатионпероксидазы и маловыраженной активации ферментов биосинтеза GSH (ПЛ), хотя они способствовали росту содержания цистеина за счет уменьшения S-цистеинилирования белков. Эффект токсикоза и модуляторов окислительного стресса не проявился на уровне и соотношении КоА/ацетил-КоА (за исключением ПЛ). Возможность некоферментных эффектов подтверждается при назначении ГПК. Обсуждается феномен редокс-активности модуляторов биосинтеза КоА с очевидной направленностью действия на систему глутатиона и активность ферментов ЦТК и ПФП на фоне купирования ОС при алюминиевом нейротоксикозе.

Ключевые слова: алюминиевый нейротоксикоз, биосинтез кофермента А, система глутатиона, окислительный стресс, ферменты цикла трикарбоновых кислот, ферменты пентозофосфатного цикла, D-пантенол, D-пантетин, D-гомопантотенат

DOI: 10.31857/S1027813323010181, EDN: ERGYVL

ВВЕДЕНИЕ

С системой кофермента А (КоА) и его основного ацил-производного ацетил-КоА, являющегося вторичным мессенджером [1] ассоциируются традиционные представления о механизмах воздействия нейродегенеративных факторов, таких как Al, Zn, β-амилоид, избыток NO, падение активности пи-

руватдегидрогеназы и др. [2, 3], приводящих к утрате холинергической функции и ослаблению энергетического метаболизма в дифференцированных нейронах, микроглиальных и астроглиальных клетках в клеточных культурах. В экспериментальной модели болезни Альцгеймера показано, что в холинергических нейронах страдает синтез и выброс ацетилхолина (АХ), лимитированного доступностью ацетил-КоА [4].

Моделирование нейровоспаления, индуцируемого бактериальным липополисахаридом (LPS), обнаруживает резистентность холинергических нейронов, но в микроглиальных клетках с падени-

Принятые в тексте сокращения: КоА – кофермент ацетилирования, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, ПФП – пентозофосфатный путь.

* Адресат для корреспонденции: 230030 Гродно, пл. Тызенгауза, 7; тел +375 29 762 3630; e-mail: n.kanunnikova@grsu.by; andrey.moiseenok@tut.by.

ем жизнеспособности развивается нитрозильный стресс, ингибируются ферменты пируватдегидрогеназного комплекса и цикла Кребса (изоцитратдегидрогеназа, аконитаза, α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс), падает содержание ацетил-КоА и АТФ [5]. Конкуренция за ацетил-КоА митохондриальных (энергетических) и цитоплазматических (АХ-синтезирующих) путей, возможно, определяет высокую восприимчивость холинэргических нейронов к нейродегенеративным патогенным факторам.

Сопутствующим (возможно, равнодействующим) фактором, лимитирующим синтез ацетил-КоА и, соответственно, ацетилхолина, может быть доступность и биосинтез КоА. Впервые описанный в 2001 г. генетический дефект пантотенаткиназы второго типа (PKAN), первого и ключевого фермента биосинтеза КоА, и приводит вследствие мутации гена PANK2 к поражению экстрапирамидной системы, задержке умственного развития и синдрому избыточного накопления железа (NBIA) в *globus pallidus* и *substantia nigra* [6]. Как оказалось впоследствии, NBIA представляет группу нейродегенеративных патологий, включающих BPAN (Beta-propeller Protein-associated Neurodegeneration), CoPAN (CoA-synthetase AN), ацерулоплазминемию и некоторые другие аутосомно-рецессивные формы NBIA. Нейродегенеративные синдромы CoPAN и BPAN тесно связаны с мутацией дефосфо-КоА-киназы (КоА-синтазы) ассоциированной с сигнальным путем Akt-mTOR, являющейся модулятором системного клеточного ответа на окислительный стресс (ОС) и ингибитором клеточной аутофагии [7–9]. Это связывает синдром NBIA и, особенно, BPAN патогенетической общностью с “большими” нейродегенерациями типа болезней Паркинсона и Альцгеймера.

Наши ранние исследования системы КоА в ЦНС при моделировании алюминиевого нейротоксикоза и введении подопытным животным *LPS E. coli* показывают драматическое падение фракций общего и свободного КоА на фоне стабильности пантотенаткиназной реакции [10, 11]. Изменения фракций КоА были выявлены как в больших полушариях мозга, так и в гиппокампе, и обусловлены при этом преимущественно действием хлорида алюминия. Введение последнего, как и холинотоксина AF64A, на фоне ОС меняет соотношение GSH/GSSG с падением GSH и общего GSH [12]. Проявление метаболического и окислительного стресса в этих или аналогичных условиях в значительной мере корригировались D-пантенолом — эффективным предшественником КоА, обладающего способностью стабилизировать системы КоА и глутатиона в синапсомембранных [13], а также, вероятно, глиальный ответ на хронический стресс в ЦНС. Способность системы биосинтеза КоА содружественно активировать биосинтез глутатиона — ключевого факто-

ра антиоксидантной защиты нейронов, вероятно, имеет сигнальную природу [14].

Поскольку D-пантенол является ксенобиотическим производным, а D-пантетин физиологическим предшественником КоА, сравнительное изучение эффективности этих соединений при алюминиевом нейротоксикозе представляет значительный интерес. В качестве препарата сравнения избрано назначение D-гомопантотената, являющегося конкурентным ингибитором пантотенаткиназы и воспроизводящим химический нокаут этого фермента в моделях нейродегенеративной патологии [15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на белых крысах-самках линии Wistar CRL: (WI) WUBR массой 150–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси.

Для моделирования метаболических нарушений, характерных для нейродегенеративной патологии, в частности болезни Альцгеймера, нами была использована модель с длительным введением животным хлорида алюминия [16]. Сообщается, что внутрибрюшинное назначение крысам $AlCl_3$ в течение 15 дней вызывало биохимические и ультраструктурные сдвиги в гиппокампе, сходные с Альцгеймер-подобным патологическим процессом с характерными дегенеративными изменениями в пирамидальных нейронах, астроцитах и олигодендроцитах [17].

В нашем эксперименте крысы были разделены на 5 экспериментальных групп ($n = 7$), первой из которых была контрольная группа, получавшая внутрижелудочно физиологический раствор. Для развития алюминиевого нейротоксикоза крысам 2–5 групп внутрижелудочно вводили раствор хлорида алюминия ($AlCl_3$) ежедневно в дозе 200 мг/кг в течение 6 недель. С 5 недели до окончания эксперимента крысам 3, 4 и 5 экспериментальных групп внутрижелудочно вводили следующие препараты в дозах 200 мг/кг: D-пантенол (ПЛ), D-пантетин (ПТ) и гомопантотенат кальция (ГПК).

После декапитации крыс собирали кровь в присутствии гепарина и извлекали мозг, из которого выделяли большие полушария.

Содержание тиобарбитурат-реагирующих соединений (ТБКРС) в плазме крови определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой [18], в мозге — по методу [19]. Содержание свободнорадикальных продуктов, реагирующих с N,N-диметил-*n*-фенилендиамином (ДФАРС), оценивали по методу [20]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли с помощью непрямого ферментативного метода, основанного на торможении аутоокисления адреналина в присутствии нитросинего тетразо-

Таблица 1. Изменения общей антиоксидантной активности (ОАА) и продуктов ОС в плазме крови крыс после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	ОАА, %	ТБКРС, нмоль/мг белка	ДФАРС, ед/мл
Контроль	59.7 ± 0.8	1.12 ± 0.09	375.64 ± 23.91
$AlCl_3$	$54.0 \pm 1.2^*$	$1.65 \pm 0.13^*$	$406.67 \pm 21.32^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	56.5 ± 0.9	$1.31 \pm 0.05\#$	$417.43 \pm 23.76^*$
$AlCl_3$ + ПТ	55.9 ± 1.3	$1.39 \pm 0.17^{*\#}$	$443.86 \pm 30.77^{*\#}$
$AlCl_3$ + ГПК	55.4 ± 1.8	$1.10 \pm 0.05\#$	$321.43 \pm 12.48\#$

Примечание. * — $p < 0.05$ по отношению к контролю, # — $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

лия [21]. Определение карбонильных белков проводили динитрофенилгидразиновым методом [22]. Общую антиоксидантную активность плазмы крови (ОАА) определяли по методу Стокса [23].

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [24] и 2-оксоглутаратдегидрогеназы (2-ОГДГ) [25] в ткани структур мозга определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве акцептора электронов феррицианид калия. Активность аконитазы измеряли ферментативным методом [26].

Для оценки интенсивности метаболизма по пентозофосфатному пути определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ) спектрофотометрически с использованием НАДФ [27].

Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) измеряли по методу Элмана с использованием ацетилтиохолина йодида в качестве субстрата [28]. Содержание церулоплазмينا измеряли по методу [29], активность каталазы по методу [30].

Для оценки тиол-дисульфидного редокс-баланса измеряли содержание общих белковых и небелковых тиолов и дисульфидов, небелковых тиолов спектрофотометрическим методом [31, 32]. Для измерения активности главной редокс-образующей системы клеток — системы глутатиона (GSH) нами было проведено изучение уровня GSH и GSSG, их соотношения и редокс-потенциала. Уровень GSH определяли спектрофотометрически с реактивом Элмана [33], окисленной формы GSSG — ферментативным методом с глутатионредуктазой [32]. Содержание S-глутатионилированных белков измеряли в соответствии с методическими рекомендациями [34].

Другие показатели системы глутатиона в ткани мозга и крови: активность глутатионтрансферазы (ГТ) измеряли в соответствии с методом [35], глутатионредуктазы (ГР) — по методу [36], глутатионпероксидазы (ГПО) — по методу [37]. Активность ферментов биосинтеза глутатиона — гамма-глутамилцистеинсинтазы (γ -GCS) и глутатионсинтазы (GS) определяли в соответствии с указаниями [38, 39].

Определение фракций КоА проводили в соответствии с указаниями [40]. Содержание свободного цистеина (CS) и цистеинилированных белков (PSSC) определяли по методу [41]. Содержание общего белка определяли по методу Брэдфорда [42] с использованием стандарта бычьего альбумина.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета GraphPad Prism v.6.0. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение. Данные проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова—Смирнова. В случае нормального распределения данных и равенства дисперсий выборок для выявления статистической значимости отличий между группами использовали двухвыборочный непарный t -критерий Стьюдента. Если распределение по выборке отличалось от нормального, то использовали ANOVA с последующим тестом Даннета. Во всех случаях статистически значимыми считали различия при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали, что потребление хлорида алюминия в течение 6 недель привело к развитию окислительного стресса, о чем свидетельствуют следующие изменения в плазме крови: повышение уровня ДФАРС и ТБКРС (табл. 1), снижение содержания церулоплазмينا (на 37%) (табл. 2) и ОАА (на 12%) (табл. 1).

Под воздействием $AlCl_3$ наблюдалась также 5-кратная активация СОД без выраженных изменений активности каталазы (табл. 2). Назначение ПТ заметно снижало активность СОД и возвращало уровень церулоплазмينا до значений в контроле, тогда как влияние ПЛ и ГПК на эти показатели проявилось слабее.

Активация свободнорадикального окисления сопровождалась снижением содержания белковых SH-групп (табл. 3), что свидетельствует о сдвигах тиол-дисульфидного баланса в результате длительного токсического воздействия хлорида алюминия. В то же время содержание карбонили-

Таблица 2. Изменения активности каталазы, СОД и уровня церулоплазмينا в плазме крови крыс после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	Каталаза, нмоль/мин/мг белка	СОД, Ед/мг белка	Церулоплазмин, мг/л
Контроль	43.41 ± 8.07	0.09 ± 0.04	697.6 ± 26.5
$AlCl_3$	39.09 ± 10.18	$0.47 \pm 0.08^*$	$437.9 \pm 29.6^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	37.97 ± 6.63	$0.45 \pm 0.06^*$	$567.3 \pm 33.1^{* \#}$
$AlCl_3$ + ПТ	38.71 ± 6.09	$0.16 \pm 0.06^{\#}$	$679.6 \pm 23.5^{\#}$
$AlCl_3$ + ГПК	30.74 ± 11.79	$0.33 \pm 0.07^{* \#}$	$531 \pm 0.031^{* \#}$

Примечание. * — $p < 0.05$ по отношению к контролю, # — $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

Таблица 3. Изменения состояния белков в плазме крови крыс после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	Белковые SH-группы		Карбонилированные белки, нмоль/мг белка
	мкмоль/мл плазмы	мкмоль/мг белка	
Контроль	450.32 ± 13.73	5.58 ± 0.29	0.444 ± 0.035
$AlCl_3$	$396.08 \pm 19.92^*$	$4.89 \pm 0.37^*$	0.450 ± 0.034
$AlCl_3$ + ПЛ	$435.25 \pm 19.01^{\#}$	$4.90 \pm 0.30^*$	0.444 ± 0.052
$AlCl_3$ + ПТ	$453.68 \pm 20.69^{\#}$	$5.09 \pm 0.26^*$	0.426 ± 0.051
$AlCl_3$ + ГПК	$371.32 \pm 18.70^*$	$3.99 \pm 0.35^{* \#}$	$0.534 \pm 0.031^{* \#}$

Примечание. * — $p < 0.05$ по отношению к контролю, # — $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

рованных белков достоверно не изменилось. Дополнительное назначение ПЛ и ПТ, но не ГПК способствовали нормализации уровня тиольных групп белков (особенно заметно по их уровню в плазме крови), а введение ГПК приводило к падению сульфгидрильных групп плазмы крови и больших полушарий мозга, более выраженному, чем эффект хлорида алюминия. Кроме того, ГПК способствовал повышению уровня карбонилирования белков, что достаточно выражено отразило его эффект как потенциального антагониста биосинтеза КоА.

Общепринятым функциональным тестом при моделировании алюминиевого нейротоксикоза является исследование активности ацетилхолинэстеразы. Указывается, что в различных нейроструктурах при моделировании нейродегенеративной патологии активность этого фермента падает или возрастает в зависимости от времени и дозы $AlCl_3$ [43]. В наших исследованиях установлено, что в больших полушариях мозга на фоне длительного потребления крысами хлористого алюминия *per os* наблюдалось значительное угнетение активности АХЭ, которая снизилась на 46%, что, очевидно, отражает нарушения нейрональной активности на фоне алюминиевого нейротоксикоза (табл. 4). После введения ПЛ и ГПК происходила стабилизация активности АХЭ на значениях, близких в контрольной группе, что только в отношении ПЛ может быть связано с

увеличением ацетил-КоА — субстрата синтеза ацетилхолина, уровень которого в ЦНС при воздействии алюминия снижается.

Несмотря на длительность воздействия хлорида алюминия, не выявлено изменений ключевых метаболитов системы КоА — свободного КоА и ацетил-КоА в ткани больших полушарий головного мозга (табл. 5). Однако при сочетанном введении хлорида алюминия и гомопантотеновой кислоты выявлено падение фракции КоА-SH при стабильности уровня ацетил-КоА. Из двух использованных предшественников КоА только D-пантенол вызвал эффект падения фракции свободного КоА и значительное увеличение содержания ацетил-КоА. Несколько неожиданным оказался эффект предупреждения этого феномена всеми модуляторами КоА, поскольку механизм действия гомопантотената принципиально отличен от пантетина и пантенола. Воздействие ПТ оказалось наиболее выраженным.

Изучение показателей энергетического метаболизма в больших полушариях мозга позволило установить значительное уменьшение интенсивности основных метаболических путей в этой структуре при алюминиевом нейротоксикозе (табл. 6): так, выявлено достоверное угнетение активности ОГДГ (в 2 раза) и аконитазы (на 40%), тогда как активность СДГ оставалась стабильной. Это согласуется с данными работ, в которых было уста-

Таблица 4. Активность ацетилхолинэстеразы в больших полушариях мозга крыс после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	АХЭ, нмоль тиохолина/мин/мг белка
Контроль	11.0 ± 0.51
$AlCl_3$	$5.9 \pm 0.79^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	$9.1 \pm 0.65^\#$
$AlCl_3$ + ПТ	$6.9 \pm 0.48^*$
$AlCl_3$ + ГПК	$9.4 \pm 0.64^\#$

Примечание. * – $p < 0.05$ по отношению к контролю, # – $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

Таблица 5. Содержание свободного КоASH и ацетил-КоА (нмоль/г ткани) в больших полушариях мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	КоASH	Ацетил-КоА
Контроль	23.24 ± 0.73	6.67 ± 0.29
$AlCl_3$	24.08 ± 1.34	7.54 ± 0.37
$AlCl_3$ + ПЛ	$20.46 \pm 0.28^{* \#}$	$9.71 \pm 0.71^{* \#}$
$AlCl_3$ + ПТ	22.41 ± 0.31	7.90 ± 0.47
$AlCl_3$ + ГПК	$19.24 \pm 0.76^{* \#}$	6.96 ± 0.16

Примечание. * – $p < 0.05$ по отношению к контрольной группе; # – $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

новлено снижение активности ОГДГ-комплекса при нейродегенерации [44, 45].

В отношении же влияния производных пантотеновой кислоты можно отметить защитное действие всех изученных производных в отношении активности ОГДГ, тогда как в отношении аконитазы корректирующий эффект не проявился или был слабо выражен (ГПК).

Обращает на себя внимание тот факт, что одновременно с угнетением активности ферментов цикла Кребса отмечалось повышение активности основных ферментов, регулирующих интенсивность метаболизма по пентозофосфатному пути: была обнаружена активация Гл-6-ФДГ и 6-ФГДГ в больших полушариях мозга на фоне воздействия хлорида алюминия (табл. 7). Это согласуется с данными работы [46], в которой было установлено, что в мозге больных болезнью Альцгеймера

наблюдалось повышение активности Гл-6-ФДГ, которая является ферментом, лимитирующим скорость метаболизма на первом этапе пентозофосфатного пути, основного пути поддержания цитозольного пула NADPH и, следовательно, редокс-баланса в клетке, опосредованного глутатионредуктазной реакцией.

Все изученные нами производные пантотеновой кислоты проявили высокий корректирующий эффект в отношении активности ферментов пентозофосфатного пути до уровня полной нормализации.

Коль скоро модель алюминиевого нейротоксикоза оказалось весьма патогномичной к нарушению систем КоА и глутатиона, что подтверждено предыдущими исследованиями с полным анализом структуры фракций КоА в больших полушариях и гиппокампе [10], а введение модуляторов биосинтеза КоА проявляет выраженные

Таблица 6. Активность ферментов энергетического метаболизма (нмоль/мг белка/мин) в больших полушариях мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	СДГ	ОГДГ	Аконитаза
Контроль	42.53 ± 5.83	11.73 ± 1.63	14.73 ± 1.19
$AlCl_3$	32.80 ± 3.85	$4.963 \pm 0.602^{**}$	$8.80 \pm 1.09^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	41.37 ± 6.62	$8.693 \pm 1.112^\#$	$4.11 \pm 0.50^{**}$
$AlCl_3$ + ПТ	38.54 ± 5.02	$11.390 \pm 1.231^\#$	$9.78 \pm 1.22^*$
$AlCl_3$ + ГПК	42.41 ± 2.10	$11.35 \pm 0.92^\#$	10.99 ± 2.89

Примечание. * – $p < 0.05$ по отношению к контролю, # – $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

Таблица 7. Активность ферментов окислительного этапа пентозофосфатного пути (нмоль НАДФН/мг белка/мин) в больших полушариях мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	6-фосфоглюконат-дегидрогеназа
Контроль	29.4 ± 1.8	26.4 ± 1.8
$AlCl_3$	$34.1 \pm 1.4^*$	$31.0 \pm 1.2^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	$28.6 \pm 1.6^\#$	$27.4 \pm 1.4^\#$
$AlCl_3$ + ПТ	$27.9 \pm 1.8^\#$	$26.7 \pm 1.6^\#$
$AlCl_3$ + ГПК	$28.1 \pm 1.6^\#$	$27.8 \pm 1.4^\#$

Примечание. * – $p < 0.05$ по отношению к контролю, # – $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

Таблица 8. Содержание белковых тиолов и дисульфидов (мкмоль/г ткани) и глутатионилированных белков (нмоль/г ткани) в больших полушариях мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	Белковые тиолы	Белковые дисульфиды	Соотношение белковых SH/SS-групп	S-глутатионилированные белки
Контроль	7.81 ± 0.11	4.03 ± 0.21	1.94 ± 0.13	83.25 ± 7.05
$AlCl_3$	$6.28 \pm 0.61^*$	$2.02 \pm 0.28^*$	$3.15 \pm 0.42^*$	$97.53 \pm 7.35^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	$8.31 \pm 0.28^*^\#$	$2.40 \pm 0.23^*^\#$	$3.47 \pm 0.23^*$	89.37 ± 2.45
$AlCl_3$ + ПТ	$8.39 \pm 0.17^*^\#$	$3.32 \pm 0.24^*^\#$	$2.54 \pm 0.19^*$	$75.90 \pm 8.48^\#$
$AlCl_3$ + ГПК	$9.20 \pm 0.30^*^\#$	$3.38 \pm 0.34^*^\#$	$2.74 \pm 0.22^*$	$62.44 \pm 4.69^*^\#$

Примечание. * – $p < 0.05$ по отношению к контролю, # – $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

корректирующие редокс-эффекты, мы исследовали общий редокс-баланс больших полушарий мозга в настоящем эксперименте. Общая оценка событий в тиол-дисульфидном балансе ЦНС свидетельствует (судя по данным показателей ОС в плазме крови) о хронической модификации белков посредством окислительной модификации и нитрозилирования, характерными для алюминиевого нейротоксикоза [15, 16].

Характеристика редокс-статуса ЦНС путем комплексного определения баланса белковых и небелковых SH/SS-групп показала снижение содержания белковых тиолов и дисульфидов с повышением SH/SS-соотношения (табл. 8). При этом производные пантотената оказали модулирующее влияние на показатели тиол-дисульфидного баланса, однако только в отношении белковых тиолов их действие оказалось односторонним.

Интересно, что на фоне алюминиевой нейродегенерации повысилось содержание S-глутатионилированных белков (табл. 8), вероятно, отражая протекторные функции этой модификации. С учетом высокой молярной концентрации тиол-модифицированных белков мозга это дает нам ответ на вопрос об основных причинах драматического падения восстановленного глутатиона и его редокс-соотношения в ЦНС при воздействии хлорида алюминия. Практически все модуляторы биосинтеза КоА снизили уровень S-глутатиони-

лированных белков в больших полушариях до уровня контрольной группы или даже ниже этих значений (табл. 8).

Кроме того, важно подчеркнуть то, что основным фактором антиоксидантной защиты и поддержания редокс баланса в мозге является система глутатиона. Нами показано, что хроническое 6-недельное внутрижелудочное введение хлорида алюминия приводит к падению уровня восстановленного глутатиона (на 21%) и значительному увеличению содержания его окисленной формы (на 15%) (табл. 9). При этом происходило сопутствующее уменьшение соотношения GSH/GSSG и, соответственно, сдвиг редокс-потенциала глутатиона в положительную сторону, что свидетельствует о снижении восстановительного потенциала системы глутатиона как основного компонента эффективного редокс-потенциала клетки в условиях алюминиевой нейродегенерации. Все примененные модуляторы биосинтеза КоА, которые вводили на протяжении 5- и 6-ой недель эксперимента, способствовали практически полной нормализации уровня и соотношения окисленной и восстановленной форм глутатиона и редокс-баланса системы глутатиона в больших полушариях мозга.

Вышеуказанные изменения системы глутатиона на фоне действия хлорида алюминия не сопровождались изменениями активности глутатионредуктазы и обеспечением системы глутатиона

Таблица 9. Состояние системы глутатиона (нмоль/мг белка) в больших полушариях мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	GSH	GSSG	GSH/GSSG	Eh, мВ
Контроль	28.3 ± 1.0	0.113 ± 0.002	268.4 ± 11.8	-249.3 ± 7.5
AlCl ₃	$22.0 \pm 2.4^*$	$0.130 \pm 0.003^*$	$168.5 \pm 5.1^*$	$-169.2 \pm 2.4^*$
AlCl ₃ + ПЛ	$27.0 \pm 2.1\#$	$0.112 \pm 0.002\#$	$231.2 \pm 30.5\#$	$-242.2 \pm 18.5\#$
AlCl ₃ + ПТ	$27.2 \pm 0.9\#$	0.114 ± 0.03	$229.5 \pm 16.3\#$	$-238.0 \pm 3.7\#$
AlCl ₃ + ГПК	$24.9 \pm 0.9\#$	0.112 ± 0.002	$209.1 \pm 102^*\#$	$-222.5 \pm 6.88^*\#$

Примечание. * — $p < 0.05$ по отношению к контролю, # — $p < 0.05$ по отношению к AlCl₃ (ANOVA, тест Тьюки).

Таблица 10. Активность глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ) и ГПО в больших полушариях мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	ГР, нмоль NADPH/мин/мг белка	ГТ, нмоль ХДНБ/мин/мг белка	ГПО (t-BOOH), мкмоль GSH/мин/мг белка
Контроль	11.74 ± 1.17	145.90 ± 15.73	36.19 ± 3.02
AlCl ₃	11.61 ± 1.75	$85.63 \pm 17.35^*$	$65.92 \pm 2.40^*$
AlCl ₃ + ПЛ	10.69 ± 0.59	$125.90 \pm 11.45\#$	$27.63 \pm 2.08^*\#$
AlCl ₃ + ПТ	10.58 ± 1.42	$121.70 \pm 10.40\#$	$22.09 \pm 2.65^*\#$
AlCl ₃ + ГПК	12.63 ± 1.17	$135.00 \pm 10.63\#$	$24.32 \pm 2.68^*\#$

Примечание. * — $p < 0.05$ по отношению к контролю, # — $p < 0.05$ по отношению к AlCl₃ (ANOVA, тест Тьюки).

избытком НАДФН (табл. 10), что может быть связано с заметной активацией ферментов окислительного этапа пентозофосфатного пути в этих условиях (см. табл. 7). Активность глутатионтрансферазы при воздействии AlCl₃ значительно снизилась (на 42%), а активность ГПО повысилась почти вдвое (табл. 10). При введении производных пантотената активность фермента в значительной мере восстанавливалась (ГТ) или снижалась (ГПО) до значений в контрольной группе.

Исходя из этого, можно полагать, что снижение содержания GSH в этих условиях, скорее, объясняется не изменениями активности ферментов окислительно-восстановительных превращений глутатиона, а усиленным его расходом на экстраклеточный экспорт в глутатионтрансферазной реакции, а также, судя по глутатионпероксидазной реакции, в реакциях посттрансляционной модификации белков на фоне окислительного стресса.

Результаты исследования активности ферментов биосинтеза глутатиона (табл. 11) указывают на его ослабление с предпочтительным снижением γ -глутамилцистеинсинтетазной реакции, зависящей от доступности лимитированного субстрата — цистеина [46]. Все модуляторы биосинтеза КоА не проявили сколько-нибудь выраженного эффекта, что может быть с определенной долей осторожности оговорено в отношении D-пантенола. Только это соединение воздействовало на соотношение КоА/ацетил-КоА в

исследованной нейроструктуре (см. табл. 5) и, возможно, привело к положительному эффекту ацетил-КоА на активность ферментов биосинтеза глутатиона.

Исследование S-глутатионилирования белков (см. табл. 8) в этих условиях приобретает ключевое значение. Высказанное предположение о γ -глутамилцистеинсинтетазной реакции как мишени алюминиевого нейротоксикоза и направленности эффектов модуляторов биосинтеза КоА подтверждается прямым исследованием цистеина. Его падение не столь выражено (13%), но полностью восстанавливается модуляторами системы КоА. Что касается процесса S-цистеинилирования белков в больших полушариях мозга, то этот процесс оказался заметно активированным на фоне действия хлорида алюминия, тогда как уровень цистеина был ниже значений в контрольной группе (табл. 12). Указанные отклонения нивелировались всеми использованными редокс-модуляторами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Помимо многочисленных кофакторных функций КоА в протекании ацетил-акцепторных и ацетил-донорных реакций, а также в качестве предшественника фосфопантетеинпротеидов [47], рассматривается неизвестный ранее процесс КоА-илирования ферментов цикла Кребса, β -окисления, метаболизма глюкозы, аминокислот и кетонных тел. Феномен КоА-илирования приобретает

Таблица 11. Активность γ -глутамилцистеинсинтетазы (γ GCS) и глутатионсинтетазы (GS) в больших полушариях мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	γ GCS	GS
Контроль	159.9 ± 6.6	143.7 ± 1.4
$AlCl_3$	$122.8 \pm 2.2^*$	$124.6 \pm 1.4^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	$136.2 \pm 1.1^{* \#}$	$133.5 \pm 0.9^{* \#}$
$AlCl_3$ + ПТ	$127.7 \pm 1.3^*$	$126.2 \pm 1.4^*$
$AlCl_3$ + ГПК	$123.0 \pm 1.9^*$	$125.1 \pm 1.2^*$

Примечание. * – $p < 0.05$ по отношению к контролю, # – $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

Таблица 12. Содержание свободного цистеина (CSH) и цистеинилированных белков (PSSC) в больших полушариях головного мозга после воздействия хлорида алюминия и введения производных пантотеновой кислоты ($M \pm SD$, $n = 7$)

Группы	CSH	PSSC
Контроль	0.78 ± 0.08	0.82 ± 0.08
$AlCl_3$	$0.68 \pm 0.09^*$	$0.98 \pm 0.07^*$
$AlCl_3$ + ПЛ	$0.76 \pm 0.08\#$	$0.84 \pm 0.05\#$
$AlCl_3$ + ПТ	$0.75 \pm 0.09\#$	$0.89 \pm 0.08\#$
$AlCl_3$ + ГПК	0.73 ± 0.18	$0.79 \pm 0.10\#$

Примечание. * – $p < 0.05$ по отношению к контролю, # – $p < 0.05$ по отношению к $AlCl_3$ (ANOVA, тест Тьюки).

доминирующий характер при ОС и является альтернативным процессу S-глутатионилирования [48]. В качестве основных мишеней КоА-илирования при ОС рассматриваются глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (регулирующая апоптоз и аксональный транспорт), НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа, киназа пируватдекарбоксилазы (PDK2), регулирующая активность пируватдегидрогеназного комплекса, аконитаза и сукцинил-КоА-синтетаза [48]. Это отражает исключительную функцию КоА как метаболического интегратора [49].

По нашим и иным данным в результате длительного воздействия хлорида алюминия происходит усиление образования свободных радикалов, активация ПОЛ и ослабление систем антиоксидантной защиты, проявляющиеся не только в мозге, но и на уровне целого организма. Эти изменения сопровождаются накоплением продуктов ОС и снижением содержания сульфгидрильных групп в белках плазмы крови.

В ЦНС эффекты последствия поступления хлорида алюминия наиболее выражены. Обращают на себя внимание изменения тиол-дисульфидного статуса в больших полушариях мозга, где сдвиг редокс-баланса проявляется в первую очередь на белковой фракции, где происходит снижение содержания и тиолов и в еще большей степени белковых дисульфидов, в результате чего соотношение белковых SH/SS-групп оказывается повышенным. Одновременно отмечается повышение содержания S-глутатионилированных белков.

Очевидно, что важную роль в поддержании редокс-баланса в нервной ткани играет система глутатиона, в которой на фоне действия хлористого алюминия содержание GSH уменьшается, а содержание GSSG увеличивается, в результате чего соотношение GSH/GSSG меньше, чем в контрольной группе. В результате редокс-потенциал системы глутатиона сдвигается в сторону окисления, что драматически сказывается на редокс-сигналинге [14].

Изменения содержания свободного цистеина и цистеинилированных белков на фоне нейродегенерации аналогичны таковым показателям системы глутатиона и являются подтверждением важной роли процессов глутатионилирования, цистеинилирования и, очевидно, КоА-илирования в посттрансляционной модификации белков, клеточной сигнализации и регуляции основных метаболических путей [14, 50], стабильного поддержания редокс-баланса в сохранении жизнедеятельности в клетках в условиях токсического поражения ткани мозга [10, 51]. По-видимому, происходящий на фоне алюминиевого нейротоксикоза сдвиг редокс-баланса за счет изменений тиол-дисульфидного статуса системы глутатиона может быть связан с ослаблением интенсивности реакций цикла трикарбоновых кислот и одновременной активацией пентозофосфатного пути метаболизма и, соответственно, усилением образования $NADPH^+$, в т.ч. для стабилизации глутатионредуктазной реакции. Снижение активности ферментов ЦТК, в частности, активности ОГДГ-комплекса являет-

ся одним из компонентов вклада окислительного стресса в развитие нейродегенеративной патологии, прежде всего вследствие дефицита сукцинил-КоА [52], и это может быть связано с посттрансляционной модификацией белка ОГДГ вследствие реакций глутатионилирования, системной модификации ферментов ЦТК за счет КоА-илирования или прямым результатом ослабления биосинтеза КоА [53].

С точки зрения митохондриального метаболизма, может иметь значение новый элемент посттрансляционной модификации белков, происходящий с участием предшественника биосинтеза КоА (и продукта его гидролиза), а именно 4'-фосфопантетеинилирование. Этот процесс имеет внутримитохондриальную локализацию, не содружественен КоА-илированию и имеет прямое отношение к регуляции реакции липоилирования мультиферментных комплексов окисления α -кетокислот [54].

В оценке митохондриальной дисфункции при моделировании болезни Альцгеймера исходят из ее ключевой роли в нарушении нейронального метаболизма, продукции АТФ, Ca^{2+} -сигналинга, мембранного потенциала и эффективной нейротрансмиссии [17]. Область коры больших полушарий и гиппокампа особенно чувствительна к воздействию ОС по причине относительно низкого уровня антиоксидантов и низкой способности нейронов к восстановлению. Патоморфологические изменения митохондрий и их подверженность воздействию аномальных белковых агрегатов (амилоидный пептид, тау-белок), продуктов ОС и токсинов характерны для клинических и экспериментальных находок при болезни Альцгеймера и ее моделировании [17]. Иммуногистохимическое исследование с использованием КоА-высокоспецифичных моноклональных антител показывает ассоциации КоА-илированных белков с тау-позитивными нейрофибрилярными клубками [55]. Тем не менее, несомненная роль КоА-дефицита в патогенезе нейродегенеративного синдрома может быть существенно дополнена вновь выявленными функциями 4'-фосфопантетеина [54, 56] и, очевидно, некоторых ацил-КоА-метаболизирующих ферментов, например таких, как стеарил-КоА-десатураза — экспрессируемая в мозге (изоформа SCD2) и патогенетически ассоциированная с нейродегенеративными заболеваниями [49, 57].

Иным, столь же мало изученным, эффектом модуляторов биосинтеза КоА является их воздействие на уровень и степень восстановленности клеточного глутатиона. Предполагается, что активация биосинтеза КоА приводит к увеличению биосинтеза глутатиона на уровне γ -глутамилцистеинсинтазной реакции [58], хотя некоторые производные пантотената могут воздействовать на экспорт глутатиона из клетки. Следует учитывать и

многократное концентрационное различие КоА и глутатиона в субклеточных структурах [53], а также роль в тиол-дисульфидном статусе тканей редокс-пар — пантетеин/пантетин и их фосфо-аналогов и дефосфо-КоА [14].

В последнее время уделяется большое внимание поиску редокс-модулирующих фармакологических агентов для предупреждения онкологической, эндокринологической и сердечно-сосудистой патологии, а также для предупреждения и коррекции процесса нейродегенерации. С этой точки зрения в арсенал редокс-фармакологии могут быть рекомендованы предшественники биосинтеза КоА. В наших исследованиях показано наличие редокс-модулирующего эффекта у таких производных пантотеновой кислоты, как пантенол и пантетин. Пантетин, пантенол и ГПК нормализуют инициированное хлоридом алюминия усиление образования свободно-радикальных продуктов и модулируют редокс-баланс ткани мозга за счет повышения редокс-потенциала системы глутатиона, причем пантетин прогнозируемо снижает уровень небелковых дисульфидов, а широко известный D-пантенол проявляет несомненную редокс-протективную (нейро-протективную? [59]) активность. Эффект модуляторов биосинтеза КоА наблюдается и в отношении активности дегидрогеназ пентозофосфатного пути, отражая активацию основного пути наработки NADPH^+ при нарушении пула глутатиона и энергообразования в цикле трикарбоновых кислот в ЦНС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воспроизведение алюминиевого нейротоксикоза у половозрелых белых крыс-самок (Al_3Cl_3 — 200 мг/кг внутрижелудочно 6 недель) приводит к развитию ОС с нарушением редокс-статуса, системы глутатиона, активности ферментов ЦТК, ПФП при стабильности уровня КоА и ацетил-КоА в больших полушариях мозга. Назначение с 5 недели эксперимента предшественников биосинтеза КоА (пантенол, пантетин) или его ингибитора (гомопантотенат) в целом обнаруживает сходные эффекты модуляции изученных показателей, включая S-глутатионилирование и S-цистеинилирование белков и редокс-потенциал системы глутатиона, что предполагает некоферментные (редокс-опосредованные) эффекты модуляторов биосинтеза КоА.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта 3.06 ГПНИ “Конвергенция” Республики Беларусь, 2016–2020 гг.; 1.64 ГПНИ Республики Беларусь “Биотехнологии”, 2019–2020 гг.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все эксперименты с лабораторными животными выполнялись в соответствии с этическими нормами, а также правилами проведения научных работ с использованием экспериментальных животных в научных исследованиях, составленными на основании Директивы 2010/63/EU и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pietrocola F., Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Madeo F., Kroemer G. // *Cell Metabolism*. 2015. V. 21. № 6. P. 805–821.
2. Szutowicz A., Bielarczyk H., Ronowska A., Gul-Hinc S., Klimaszewska-Łata J., Dyś A., Zysk M., Pawełczyk T. // *Biochem. Soc. Trans.* 2014. V. 42. № 4. P. 1101–1116.
3. Szutowicz A., Bielarczyk H., Ronowska A. // *Neurochem. Res.* 2013 V. 38. № 8. P. 1523–1542.
4. Ronowska A., Szutowicz A., Bielarczyk H., Gul-Hinc S., Klimaszewska-Łata J., Dyś A., Zysk M., Jankowska-Kulawy A. // *Front. Cell. Neurosci.* 2018. V. 10. № 12. P. 169.
5. Ferreira-Vieira T.H., Guimaraes I.M., Silva F.R., Ribeiro F.M. // *Current Neuropharmacol.* 2016. V. 14. № 1. P. 101–115.
6. Klimaszewska-Łata J., Gul-Hinc S., Bielarczyk H., Ronowska A., Zysk M., Grużewska K., Pawełczyk T., Szutowicz A. // *J. Neurochem.* 2015. V. 133. № 2. P. 284–297.
7. Venco P., Dusi S., Valletta L., Tiranti V. // *Biochem. Soc. Trans.* 2014. V. 42. № 4. P. 1069–1074.
8. Paudel R., Li A., Wiethoff S., Bandopadhyay R., Bhatia K., Silva R., Houlden H., Holton J. L. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2015. V. 3. P. 39.
9. Hogarth P. // *J. Movement Disorders.* 2015 V. 8. № 1. P. 1–13.
10. Moiseenok A.G., Omelyanchik S.N., Gurinovich V.A., Evkovich I.N., Petukhova T.P. // *News Biomedical Sciences.* 2005. V. 1. P. 51–55.
11. Moiseenok A.G., Omel'yanchik S.N., Sheval'e A.A., Katkovskaya I.N., Elchaninova M.A., Pekhovskaya T.A., Kovalenchik I.L. // *Neurochem. J.* 2010. V. 4. № 1. P. 30–34.
12. Stepanichev M., Libe M.L., Chernyshevskaya I.A., Moiseenok A.G., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2007. V. 1. № 3. P. 244–248.
13. Слышенков В.С., Курко С.Н., Мойсеев А.Г. // *Весті НАН Беларусі.* 2005. № 2. С. 78–81.
14. Мойсеев А.Г. // *Биохимия и молекулярная биология: сб. науч. тр. Минск.* 2019. Вып. 3. С. 91–93.
15. Zhang Y.-M., Chohnan S., Virga K.G., Stevens R.D., Ilkayeva O.R., Wenner B.R., Bain J.R., Newgard C.B., Lee R.E., Rock C.O., Jackowski S. // *Chemistry & Biology.* 2007. V. 14. P. 291–302.
16. Prakash A., Kumar A. // *Basic Clin. Pharm. Toxicol.* 2009. V. 105. P. 98–104.
17. Aboehwata H.R., El-Kott A.F., Abd-Ella E.M., Yousef H.N. // *Brain Sci.* 2020. V. 10. P. 628. <https://doi.org/10.3390/brainsci10090628>
18. Grintzalis K., Zisimopoulos D., Grune T., Weber D., Georgiou C.D. // *Free Rad. Biol. Med.* 2013. V. 59. P. 27–35.
19. Durfinova M., Brechtlova M., Liska B., Baroskova Z. // *Chem. Pap.* 2007. V. 61. № 4. P. 321–325.
20. Verde V., Fogliano V., Ritieni A., Maiani G., Morisco F., Caporaso N. // *Free Radical Research.* 2002. V. 36. № 8. P. 869–873.
21. Сипома Т.В. // *Биомед. химия.* 2013. Т. 59. Вып. 4. С. 399–410.
22. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadman E.R. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 186. P. 464–478.
23. Stocks J., Gutteridge J.M., Sharp R.J., Dormandy T.L. // *Clinical Science and Molecular Medicine.* 1974. V. 47. № 3. P. 215–222.
24. Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. // *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен).* Л.: Изд-во ЛГУ. 1982. С. 207–212.
25. Биссвангер Х. *Практическая энзимология* М.: Бинном. 2013. С. 132.
26. Quirós P.M. // *Meth. Mol. Biol.* 2018. V. 1731. Human Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7595-2_5
27. Ninfali P., Aluigi G., Pompella A. // *Brain Research Protocols.* 1997. V. 1. № 4. P. 357–363.
28. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Feather-Stone R.M. // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. № 2. P. 91–95.
29. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биологической лабораторной диагностике* 2002. Т. 2. 2-е издание. 463 с.
30. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. // *Лаб. дело.* 1988. № 1. С. 16–19.
31. Patsoukis N., Georgiou C.D. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. № 7. P. 1783–1792.
32. Anderson M. // *Methods Enzymol.* 1985. V. 113. P. 548–555.
33. Rahman I., Kode A., Rahman I., Biswas S.K. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 6. P. 3159–3165.
34. Menon D.A., Board P.G. // *Anal. Biochem.* 2013. V. 433. P. 132–136.
35. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 22. P. 7130–7139.
36. Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 175. P. 408–413.
37. Flohé L., Günzler W.A. // *Methods Enzymol.* 1984. V. 105. P. 114–121.
38. Volohonsky G., Tuby C.N., Porat N., Wellman-Rousseau M., Visvikis M.A., Leroy P., Rashi S., Steinberg S., Stark A.-A. // *Chem. Biol. Interact.* 2002. V. 140. № 1. P. 49–65.
39. Oppenheimer L. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 12. P. 5184–5190.
40. Гуринович В.А., Дорофей Д.С. // *Эксперим. и клинич. фармакол. Матер. межд. науч.-практич. конф., Гродно, ГрГМУ.* 2011. С. 49–53.
41. Patsoukis N., Georgiou C.D. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. P. 1783–1792.
42. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
43. Verstraeten S.V., Aimo L., Oteiza P.I. // *Arch. Toxicol.* 2008. V. 82(11). P. 789–802.

44. Shi Qingli, Xu Hui, Kleinman W.A., Gibson G.E. // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008. V. 1782. P. 229–238.
45. Mastrogiacomo F., Bergeron C., Kish S.J. // *J. Neurochem.* 1993. V. 61. P. 2007–2014.
46. Bubber P., Haroutunian V. // *Ann. Neurol.* 2005. V. 57. P. 695–703.
47. Мойсеёнок А.Г. Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина). Минск. 1980. С. 33–48.
48. Gout I. // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46. № 3. P. 721–728.
49. Dobrzyn P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 8. P. 4371. doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms23084371
50. Todorovic S.M., Jevtovic-Todorovic V. // *Antioxid. Redox Signal.* 2016 V. 21. № 6. P. 880–891.
51. Семенович Д.С., Канунникова Н.П., Мойсеёнок А.Г. // Докл. НАН Беларуси. 2020. Т. 64. № 1. С. 78–85.
52. Subramanian C., Yao J., Frank M.W., Rock C.O., Jackowski S. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020. V. 1866. № 5. P. 165663. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165663
53. Czumaj A., Szrock-Jurga S., Hebanowska A., Turyn J., Swierczynski J., Sledzinski T., Stelmanska E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 9057. https://doi.org/10.3390/ijms21239057
54. Мойсеёнок А.Г., Гуринович В.А., Катковская И.Н., Лукиенко Е.П., Максимчик Ю.З. // Кислород и свободные радикалы: сб. матер. науч.-практ. конф. с междунар. участ. Гродно. ГрГМУ. 2022. С. 116–118. https://drive.google.com/drive/folders/1YdEwdKD-KuY_5K2gMxfDarDuu_xDvOfcp?usp=sharing
55. Lashley T., Tossounian M.-A., Heaven N.C., Wallworth S., Peak-Chew S., Bradshaw A., Cooper J.M., Silva R., Srai S.K., Malanchuk O., Filonenko V., Koopman M.B., Rüdiger S.G.D., Skehel M., Gout I. // *Front. Cell Neurosci.* 2021. V. 15. P. 739425. https://doi.org/10.3389/fncel.2021.739425
56. Мойсеёнок А.Г., Катковская И.Н. // Сборник статей междунар. науч.-практ. конф. посвящ. 50-летию Института биохимии биологически активных соединений НАНБ, Гродно. 2021. С. 305–314.
57. O'Neill L.M., Guo C.A., Ding F., Phang Y.X., Liu Z., Shamsuzzama S., Ntambi J.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 8619. https://doi.org/10.3390/ijms23084371
58. Iskusnykh I.Y., Zakharova A.A., Pathak D. Glutathione in Brain disorders and aging. *Molecules*. 2022. V. 27. P. 324.
59. Онуфриев М.В., Степанчиков М.Ю., Лазарева Н.А., Катковская И.Н., Тишкина А.О., Мойсеёнок А.Г., Гуляева Н.В. // *Нейрохимия*. 2010. Т. 27. № 2. С. 170–175.

Enzyme a Biosynthesis System on Manifestation of Metabolic Stress and Glutathione System in the CNS under Aluminium Neurotoxicosis

D. S. Semenovich^a, V. A. Gurinovich^a, E. P. Lukiyenko^a,
I. N. Katkovskaya^a, O. V. Titko^a, N. P. Kanunnikova^b, and A. G. Moiseenok^a

^a*Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances, NAS of Belarus, Grodno, Belarus*

^b*Yanka Kupala's Grodno State University, Grodno, Belarus*

^c*Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Moscow, Russia*

Alzheimer's-like disease was simulated in female adult Wistar CRL(WI) WUBR rats by 6-week intragastric administration of aluminium chloride at a dose of 200 mg/kg body mass. In the presence of developed oxidative stress (OS), we found a decrease in the activities of tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) enzymes and an increase in the activities of pentose phosphate pathway (PPP) dehydrogenases as well as a reduction of SH- and SS-groups in proteins (P) along with the increased SH/SS ratio and glutathionylation with simultaneous decreases of glutathione (GSH) and the GSH/GSSG ratio and its redox potential in the brain hemispheres. The glutathione system enzymes were changed multidirectionally, with glutathione reductase remaining stable. Decreased activities of GSH biosynthesis enzymes and cysteine content were noticed. The intragastric administration of the CoA biosynthesis modulators D-panthenol (PL), D-pantethine or D-homopantothenate (HPA) at a dose of 200 mg/kg since the 5th week of the experiment caused either reduction or leveling of OS manifestations in blood plasma, an increase in acetyl cholinesterase, normalization of the activities of TCA cycle and PPP enzymes, P-SH level (not the SH/SS ratio) and a considerable reduction of S-glutathionylation as well as increases in GSH level, the GSH/GSSG ratio and redox potential in the hemispheres. The effect of CoA system modulators was manifested in activation of glutathione transferase, a decrease of glutathione peroxidase and less evident activation of GSH biosynthesis enzymes (PL) although they contributed to the elevation of cysteine content due to the reduced protein S-cysteinylation. The levels and the ratio of CoA/acetyl-CoA (except for PL) were not changed by toxicosis and the OS modulators. The feasibility of non-coenzyme effects was confirmed by the administration of HPA. The phenomenon of redox activity of the CoA biosynthesis modulators with clearly directional effects on the glutathione system and the TCA cycle and PPP enzymes during alleviation of OS and aluminium neurotoxicosis is discussed.

Keywords: aluminium neurotoxicosis, CoA biosynthesis, glutathione system, oxidative stress, tricarboxylic acid cycle enzymes, pentose phosphate pathway enzymes, D-panthenol, D-pantethine, D-homopantothenate

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ РЕЦЕПТОРОВ МОЗГА В МЕХАНИЗМЕ ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ОКСИМА 4-БЕНЗОИЛПИРИДИНА ГИЖ-298

© 2023 г. С. А. Литвинова¹, *, Е. А. Кондрахин¹, Т. А. Воронина¹, Е. В. Васильева¹, Г. И. Ковалев¹

¹ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.04.2022 г.

После доработки 07.06.2022 г.

Принята к публикации 08.09.2022 г.

Целью исследования явилось изучение участия глутаматных, дофаминовых и серотониновых рецепторов в механизме противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298). Установлено, что в мозге крыс, после тонико-клонических судорог, вызванных однократным корнеальным воздействием максимального электрошока (МЭШ), наблюдается увеличение на 27% плотности (Bmax) NMDA-рецепторов в гиппокампе и снижение на 25% количества mGluII-рецепторов (mGluR_{2/3}) во фронтальной коре, при этом количественные показатели 5-HT_{2A}-рецепторов во фронтальной коре не изменялись. ГИЖ-298 (60 мг/кг/однократно) устраняет судорожные проявления, но не противодействует, вызванному МЭШ, количественному изменению глутаматных рецепторов и не влияет на них в условиях нормы, без МЭШ. В тестах на мышах субхроническое (5 дней) корнеальное воздействие МЭШ снижает на 17% плотность (Bmax) D₂-рецепторов в стриатуме и не изменяет данный параметр во фронтальной коре. ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дней) устраняет клонико-тонические судороги у мышей и препятствует снижению количества D₂-рецепторов на мембранах стриатума, а также на 13% увеличивает их количество у мышей без МЭШ в той же структуре. Полученные данные свидетельствуют о выраженных изменениях функциональной активности NMDA, mGluII и D₂ рецепторов в мозге животных, перенесших судороги. Противосудорожные эффекты ГИЖ-298 сопровождаются восстановлением количества D₂-рецепторов в стриатуме.

Ключевые слова: эпилепсия, ГИЖ-298, производные оксимов 4-бензоилпиридина, максимальный электрошок, D₂-рецепторы, радиолигандный метод, рецепторное связывание

DOI: 10.31857/S1027813323010120, **EDN:** EQQAJJ

ВВЕДЕНИЕ

Основным возбуждающим нейромедиатором в головном мозге является глутамат для всех основных функций головного мозга, включая поддержание уровня бодрствования, психологической и физической активности, регуляцию поведения, обучение, память, восприятие чувствительных и болевых импульсов. Однако, чрезмерно активируя ионотропные (iGlu – NMDA, AMPA) и/или I типа метаботропные (mGluR1) глутаматные рецепторы, глутамат способствует повреждению головного мозга, возникающему в острой форме после эпилептического припадка, что является одним из путей индукции эпилептогенеза. Применение антагонистов iGlu рецепторов в клинической практике эпилепсии ограничено возникновением побочных эффектов, вызванных ингибированием быстрой возбуждающей синаптической передачи. Единственным зарегистрированным препара-

том, избирательно воздействующим на iGlu рецепторы, и применяемый в терапии фокальной эпилепсии, является перампанел [1].

Избыточная активность глутаматергической системы может контролироваться ауторецепторами. К ауторецепторам, осуществляющим пресинаптический контроль высвобождения глутамата и постсинаптический контроль нейрональных ответов относятся метаботропные рецепторы mGluR II типа (mGluR_{2/3}), активация которых уменьшает частоту и амплитуду возбуждающего постсинаптического тока, вызывая противосудорожное действие в ряде моделей лимбических и генерализованных моторных припадков [2]. Дофаминергическая система также принимает участие в регуляции активности глутаматергической синаптической передачи посредством модуляции митогенактивированных киназ (ERK1/2) [3–6]. Стимуляция D₁-подобных рецепторов вызывает фосфорилирование ERK1/2, что, в свою очередь, приводит к выбросу глутамата и увеличению нейрональной возбудимости, ко-

* Адресат для корреспонденции: 125315, Москва, Балтийская ул., 8, тел. (495) 601-21-14, e-mail: sa_litvinova@mail.ru.

торая подавляется при активации D_2/D_3 зависимого пути [4, 7–9]. Влияние серотонергической системы на нейротрансдукцию зависит от вида и линии животных, а также используемой модели эпилепсии. С одной стороны, серотонин (5-НТ) увеличивает глутаматергические спонтанные возбуждающие постсинаптические токи (EPSC) в пирамидных нейронах префронтальной коры и этот эффект опосредован участием 5-НТ_{2A}-рецепторов [10, 11]. В то же время, активация 5-НТ_{2A}-рецепторов у крыс линии GAERS (модель абсансной эпилепсии) усиливает тормозные постсинаптические токи (IPSC) таламокортикальных нейронов, уменьшая выраженность абсансов [12, 13]. Таким образом, поиск возможных мишеней регуляции активности нейронального возбуждения в условиях патологической активации нейронов, вызванной условиями модели судорог, может способствовать лучшему пониманию патогенеза эпилепсии и служить предпосылками к созданию противосудорожных препаратов.

Ранее в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова были синтезированы и изучены производные оксимов бензоилпиридина, которые обладают выраженными противосудорожными свойствами в различных моделях эпилепсий [14]. Среди данного химического ряда соединений наиболее ярким по своим противосудорожным эффектам оказалось соединение ГИЖ-298 (диалкиламино-этиловый эфир оксима 4-бензоилпиридина), обладающее противосудорожным действием в тесте модели максимального электрошока (МЭШ) и в моделях хронической фокальной кобальт-индуцированной эпилепсии и эпилептического статуса, вызванного введением нейротоксина тиолактона гомоцистеина (D,L-homocysteine thiolactone) [15]. Изученный ранее нейрохимический профиль ГИЖ-298 выявил способность соединения противодействовать чрезмерной функциональной активности дофаминергической системы в нигростриатных путях крыс в условиях электрошоковой модели судорог [16].

Целью настоящего исследования явилось изучение рецепторных механизмов противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина ГИЖ-298 в условиях судорог, вызванных максимальным электрошоком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены на беспородных мышках-самцах массой тела 22–24 г. и крысах-самцах массой тела 220–250 г. (питомник “Столбовая”), содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-ти часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Для исключения влияния суточных биоритмов на скорость биосинтеза и метаболизма нейромедиаторов, эксперименты проводили между 10 и 13 часами дня.

Животных содержали в условиях лабораторного вивария при 12-ти часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму в соответствии с ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными” от 01 июля 2016 г.

Тест максимальный электрошок (МЭШ)

Тест МЭШ осуществляли в соответствии с Руководством [17]. МЭШ проводили с помощью установки Rodent Shocker RS 221 (Harvard Apparatus, GmbH) для крыс однократно (параметры тока – 50 Hz, 250 V, 10–11 мА, продолжительность 0.2 с) и для мышей 5-кратно (параметры тока – 50 Hz, 250 V, 10–11 мА, продолжительность 0.3) при помощи специальных корневых электродов, смоченных в солевом растворе (физиологический раствор). В результате у животных развивались генерализованные тонико-клонические судороги. Для выраженности судорожных реакций использовали балльную систему оценки, где: 0 баллов – отсутствие судорог; 1 балл – клонические судороги передних и задних конечностей; 2 балла – тонус передних конечностей и клонические подергивания задних конечностей; 3 балла – тоническая экстензия передних и задних конечностей.

Обработку полученных данных в тесте МЭШ проводили следующим образом: нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и стандартных ошибок среднего ($m \pm S.E.M.$). Данные обрабатывали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, а данные, представленные в альтернативной шкале, обрабатывали с помощью метода точной вероятности Фишера. Во всех случаях использовали двухсторонний критерий при критическом уровне значимости $\alpha = 0.05$.

Эксперименты проводились в две серии.

В 1 серии определяли характеристики связывания с 5-НТ_{2A}-, NMDA- и mGluII-рецепторами в структурах мозга крыс после однократного (1 дн) нанесения максимального электрошока (МЭШ) и введения ГИЖ-298 (диалкиламино-этиловый эфир оксима 4-бензоилпиридина). ГИЖ-298 вводили в дозе 60 мг/кг (внб) за 40 мин до проведения теста МЭШ. Через 5 мин крыс декапитировали и извлекали на льду префронтальную кору, гиппокамп и стриатум. Структуры замораживали в жидком азоте и взвешивали.

Крысы были разделены случайным образом на 4 экспериментальные группы: 1) Интактный контроль, получали физиологический раствор 1 дн, $n = 8$; 2) ГИЖ-298 без МЭШ (60 мг/кг/1 дн/внб), $n = 8$; 3) контроль МЭШ 1 дн, получали физиологический раствор 1 дн, $n = 8$; 4) МЭШ 1 дн + ГИЖ-298 (60 мг/кг/1 дн/внб), $n = 11$.

Во 2 серии опытов определяли характеристики связывания D_2 -рецепторов в структурах мозга мышей после 5-кратного (5 дн) нанесения МЭШ и введения ГИЖ-298. ГИЖ-298 вводили в дозе 60 мг/кг (внб) в течение 5 дней за 40 мин до проведения теста МЭШ. Через 5 мин мышей декапитировали и извлекали на льду префронтальную кору и стриатум, которые замораживали в жидком азоте и взвешивали.

Мыши были разделены случайным образом на следующие экспериментальные группы: 1) интактный контроль, получали физиологический раствор 5 дн, $n = 8$; 2) ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дн/внб), $n = 8$; 3) контроль МЭШ 5 дн, получали физиологический раствор 5 дн, $n = 14$; 4) МЭШ 5 дн + ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дн/внб), $n = 8$.

*Выделение плазматических мембран
с 5-HT_{2A}-рецепторами коры мозга*

Изучение радиорецепторного связывания с 5-HT_{2A}-рецепторами серотонина проводили по методу Leysen et al. с модификациями [18]. Самцов крыс массой 220–250 г. декапитировали, извлекали фронтальную кору, которую гомогенизировали в 10 мл ледяного (0–4°C) 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7.4 при 4°C), используя гомогенизатор Potter S “тефлон–стекло”.

Полученную суспензию центрифугировали при 40000 g в течение 20 мин в ультрацентрифуге “L7-35” (Beckman Coulter). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объеме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 10 мл инкубационного буфера и использовали по 250 мкл в процедуре связывания с $[G-^3H]$ -лигандами рецепторов. Инкубационный буфер для связывания с 5-HT_{2A}-подтипом рецепторов префронтальной коры крыс содержал 50 мМ Tris-base, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂·2H₂O, 1 мМ MgCl₂·6H₂O (pH 7.4 при 37°C).

*Выделение плазматических мембран
с NMDA-рецепторами гиппокампа*

Выделение плазматических мембран гиппокампа проводили по модифицированным методам [19, 20]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при –80°C. В день эксперимента гиппокампы размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон–стекло” в 10 объемах буфера № 1 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, 0.32 М сахароза, pH 7.6). Гомогенат разбавляли 50 объемами буфера № 2 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, pH 7.6) и центрифугировали при 1000 g 10 мин на ультрацентрифуге

“Optima L-70K” (Beckman Coulter). Супернатант сливали и вновь центрифугировали при 25000 g 20 мин. Для увеличения выхода белка эту операцию проводили дважды. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и центрифугировали при 8000 g 20 мин. Супернатант и верхний коричневатый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 3 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, 1 мМ Na₄EDTA, pH 7.6) и троекратно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и однократно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объемах буфера № 2 и замораживали в криопробирках в жидком азоте. В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 10 объемах буфера № 2, центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера № 2.

*Выделение плазматических мембран
с mGluR-рецепторами коры мозга*

Выделение mGluR-рецепторов проводили по методу [21]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при –80°C. В день эксперимента фронтальную кору размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон–стекло” в 25 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1). Гомогенат центрифугировали при 48000 g 10 мин. Полученный осадок гомогенизировали в буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1) и инкубировали при 37°C 10 мин, затем центрифугировали при 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 5 объемах буфера и замораживали в криопробирках при –80°C. В день эксперимента мембраны размораживали и центрифугировали 3 раза в буфере (50 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl₂, pH 7.4) 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера (50 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl₂, pH 7.4). Концентрация белка в образцах мембран составляла 0.25 мг/мл.

*Выделение плазматических мембран
с D₂-рецепторами коры мозга и стриатума*

В экспериментах по радиолигандному анализу D_2 -рецепторов использовали метод, описанный в литературных данных [22]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в холодильнике при температуре –80°C. В день эксперимента фронтальную кору больших полушарий мозга и стриатумы гомогенизировали в 10 объемах ледяного буфера (HEPES, 50 мМ; NaCl, 118 мМ; CaCl₂, 2.5 мМ; KCl, 4.8 мМ; MgSO₄, 1.2 мМ; pH = 7.4) в гомогенизаторе “стекло–тефлон”. Гомогенат центрифугировали в ультрацен-

Таблица 1. Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на выраженность судорожных проявлений у крыс в тесте антагонизма с МЭШ (однократно)

Группа животных	Баллы судорожных реакций	Количество крыс с тонической экстензией %/а.е.
Крысы-самцы		
МЭШ, однократно	2.88 ± 0.11	87.5 (7/8)
МЭШ + ГИЖ-298, однократно	$2.18 \pm 0.15^*$	28 (3/11)#

Примечания: * — достоверность значений от группы “МЭШ”, при $P \leq 0.05$ (критерий Манна–Уитни; # — достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) при $P \leq 0.05$ (точный критерий Фишера).

трифуге “Optima L-70K” (Beckman Coulter) в течение 30 мин при 17500 g. Полученный осадок суспендировали в 20 объемах холодной дистиллированной воды и оставляли для гидролиза на час. Взвесь центрифугировали 30 мин при 17500 g. Полученный осадок ресуспендировали в буфере и повторно обрабатывали в том же режиме. Итоговый осадок суспендировали в буфере до конечной концентрации 4–6 мг исходной ткани на 1 мл буфера.

Радиолигандный метод оценки рецепторного связывания

В экспериментах по радиолигандному связыванию использовали [^3H]Ketanserin (для 5-HT_{2A}-рецепторов) с удельной активностью 60 Кюри/ммоль, [^3H]МК-801(+) (для NMDA-рецепторов) с удельной активностью 210 Кюри/ммоль, [^3H]LY354740 (для mGluII-рецепторов) с удельной активностью 42 Кюри/ммоль, [^3H]Sulpiride(-) (для D₂-рецепторов) с удельной активностью более 40 Кюри/ммоль. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 50 мкл меченого лиганда, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченого лиганда (1 мМ). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч (для 5-HT_{2A}- и NMDA-рецепторов), при комнатной температуре в течение 1 ч (для mGluII- и D₂-рецепторов). По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman), предварительно смоченные в 0.3% полиэтиленимине в течение 2 ч при комнатной температуре. Каждую пробирку промывали два раза холодным буфером, затем фильтры промывали два раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г РРО, 0.2 г РОРОР на 1 л толуола).

Обработка и представление результатов

Результаты экспериментов *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин K_d и $B_{\max}$, отражающих степень сродства рецептора к лиганду

(нМ) и количество мест связывания лиганда (фмоль/мг белка) соответственно. Для анализа насыщения и получения характеристик связывания $B_{\max}$ и K_d измеряли специфическое связывание для NMDA рецепторов в диапазоне концентраций от 0.5 до 20 нМ, для mGluII рецепторов — от 12.5 до 200 нМ, для 5-HT_{2A}-рецепторов — от 1.25 до 20 нМ, для D₂-рецепторов — от 1.25 до 40 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Для построения кривых насыщения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 2-х повторностях.

Радиоактивность определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer) с эффективностью счета 42–46%. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури (1951). Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программы GraphPad Prism 8 и Statistica 6.0. GraphPad Prism 8 содержит стандартные алгоритмы обсчета полученных данных по использованным вариациям байдинга. Оценку рассчитанных коэффициентов регрессии и корреляции проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента и доверительных интервалов. Результаты представлены в виде “mean $\pm$ S.E.M”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование на крысах

Однократное нанесение МЭШ у крыс вызывало развитие тонико-клонических судорог, которые заканчивались тонической экстензией передних и задних конечностей в 87.5% случаев. ГИЖ-298 достоверно снижал выраженность судорожных реакций, вызванных МЭШ, и уменьшал количество крыс с полной тонической экстензией конечностей (табл. 1).

В мозге крыс, перенесших однократно МЭШ, наблюдалось увеличение плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе до 2753 ± 193 фмоль/мг по отношению к контролю без МЭШ (2161 ± 105 соответственно) и снижение метаботропных глутаматных рецепторов mGluII в коре до 1149 ± 49 фмоль/мг относительно контроля (1529 ± 69 соответствен-

Таблица 2. Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на глутаматные и серотониновые рецепторы в структурах мозга крыс (кора, гиппокамп) в тесте МЭШ (однократно)

Рецепторы	Константы связывания	Контроль (физ. р-р)	ГИЖ-298	МЭШ	ГИЖ-298 + МЭШ
NMDA гиппокамп	$B_{\max}$, фмоль/мг белка	2161 ± 105	2204 ± 90	$2753 \pm 193^*$	$2481 \pm 71^*$
	K_d , нМ	8.0 ± 1.2	8.3 ± 0.9	9.6 ± 1.3	8.8 ± 1.3
mGluII кора	$B_{\max}$, фмоль/мг белка	1529 ± 69	1398 ± 53	$1149 \pm 49^*$	$1156 \pm 49^*$
	K_d , нМ	90.8 ± 18.2	98.1 ± 12	102.0 ± 19.4	99.4 ± 18.1
5-HT _{2A} кора	$B_{\max}$, фмоль/мг белка	746 ± 35	785 ± 37	790 ± 33	776 ± 71
	K_d , нМ	13.44 ± 1.4	15.2 ± 1.2	13.9 ± 2.3	14.5 ± 2.5

Примечание: * — статистически значимые отличия от контроля при $p < 0.05$ (критерий Стьюдента).

Таблица 3. Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на выраженность судорожных проявлений у мышей в тесте МЭШ (5 дней)

Группа животных	Баллы судорожных реакций	Количество крыс с тонической экстензией %/а.е.
Мыши-самцы		
МЭШ, 5-й день	2.7 ± 0.29	71 (10/14)
МЭШ + ГИЖ-298, 5-й день	$0.4 \pm 0.18^{**}$	0 (0/8) #

Примечания: данные в таблице представлены за 5-й день эксперимента. ** — достоверность значений от группы “МЭШ” при $P \leq 0.01$ (критерий Манна–Уитни; # — достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) при $P \leq 0.05$ (точный критерий Фишера).

но). При изучении 5-HT_{2A}-рецепторов во фронтальной коре крыс было показано, что их плотность не изменялась под воздействием МЭШ (табл. 2). ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг при однократном введении в условиях используемой судорожной модели не влиял на измененные показатели глутаматергических рецепторов — NMDA (в гиппокампе) и mGluII (во фронтальной коре), а также не влиял на их количество без воздействия МЭШ. Плотность 5-HT_{2A}-рецепторов во фронтальной коре крыс также не изменялась под воздействием ГИЖ-298 как в условиях нормы, так и после МЭШ (табл. 2).

Исследования величин константы диссоциации (K_d) показало, что ГИЖ-298 не изменял степень сродства исследуемых рецепторов к соответствующим лигандам (нМ) — [³H]МК-801(+) (NMDA), [³H]LY 354740 (mGluII), [³H]Ketanserin (5-HT_{2A}) относительно значений контрольной группы крыс (табл. 2).

Исследование на мышах

При субхроническом 5-дневном нанесении МЭШ через корневые электроды около 70% мышей демонстрировали тонико-клонические судорожные реакции. На фоне ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг/5 дней наблюдалось значительное снижение тяжести судорожных реакций и полная защита от развития тонической экстензии конечностей (табл. 3).

Изучение характеристик связывания с D₂-рецепторами проводили в стриатуме и коре мы-

шей. Установлено, что МЭШ (5 дней) снижал до 660 ± 7.0 фмоль/мг по отношению к контролю (797 ± 21 соответственно) характеристики связывания [³H](–)Сульпирида с D₂ рецепторами стриатума мышей, однако не влиял на данный показатель во фронтальной коре (табл. 4, рис. 1). После субхронического введения ГИЖ-298 (5 дней) в дозе 60 мг/кг на фоне МЭШ и без МЭШ при определении мест связывания для [³H](–)Сульпирида с D₂-рецепторами было установлено, что в коре не наблюдалось статистически значимых отличий величины $B_{\max}$ для D₂-рецепторов от контрольной группы с МЭШ и без МЭШ. В стриатуме ГИЖ-298 статистически достоверно увеличивал до 821 ± 29 фмоль/мг плотность D₂-рецепторов по сравнению с группой животных, получавших МЭШ (660 ± 7.0 соответственно). Кроме того, в данной структуре ГИЖ-298 статистически достоверно увеличивал количество D₂-рецепторов у интактных животных без МЭШ. ГИЖ-298 не изменял величину K_d по сравнению с контролем (табл. 4, рис. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование направлено на выявление способности соединения с противосудорожным действием, ГИЖ-298, к рецепторной регуляции активности нейронального возбуждения. С этой целью среди мишеней были выбраны возбуждающие глутаматергические рецепторы NMDA подтипа и, модулирующие их активность — mGluII, 5-HT_{2A} и D₂ рецепторы.

Таблица 4. Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на D₂-дофаминовые рецепторы в структурах мозга мышей (кора, стриатум) в тесте МЭШ (5 дней)

Рецепторы	Константы связывания	Контроль (физ. р-р)	ГИЖ-298	МЭШ	ГИЖ-298 + МЭШ
D ₂ , кора	$B_{\max}$, фмоль/мг белка	554 ± 91	533 ± 89	529 ± 62	505 ± 77
	K_d , нМ	17.8 ± 2.2	16.9 ± 3.1	16.6 ± 2.2	15.4 ± 2.7
D ₂ , стриатум	$B_{\max}$, фмоль/мг белка	797 ± 21	899 ± 30*	660 ± 7.0*	821 ± 29#
	K_d , нМ	16.8 ± 1.0	16.6 ± 1.2	16.7 ± 0.3	16.3 ± 1.3

Примечание: данные в таблице представлены за 5-й день эксперимента. * – статистически значимые отличия от контроля при $p < 0.05$ (критерий Стьюдента); # < 0.05 статистически значимое отличие от группы МЭШ (t -критерий Стьюдента).

Анализ рецепторного профиля мозга крыс после судорог, вызванных однократным нанесением МЭШ, показал увеличение плотности NMDA-рецепторов (на 27%) в гиппокампе и уменьшение количества mGluII рецепторов (на 25%) во фронтальной коре животных. ГИЖ-298 не противодействовал количественному изменению NMDA и mGluRII глутаматных рецепторов и не изменял их константы диссоциации (K_d) с соответствующими лигандами. По данным литературы количественное увеличение NMDA рецепторов в мозге животных наблюдается при многих моделях эпилепсии, что сопровождается изменением субъединичного состава, в основном, за счет увеличения кальций-проницаемых NR2B-содержащих субъединиц [23, 24]. Одновременно с этим у модельных животных изменяются свойства метаботропных глутаматных подтипов рецепторов [25, 26], контролирующих активность NMDAR в норме. Их распределение в центральной нервной системе обеспечивает платформу как для пресинаптического контроля высвобождения глутамата, так и для постсинаптического контроля нейронных ответов на глутамат [2, 27, 28]. Подобные количественные и качественные перестройки ионотропных [29, 30] и метаботропных [2, 28] глутаматных рецепторов определяются у больных эпилепсией, и приводят к нарушению процесса обратного торможения в синаптической щели, делая ткани мозга более возбудимыми. ГИЖ-298 не препятствует возрастающей при судорогах активности глутаматергической нейротрансмиттерной передачи ни прямым воздействием на NMDA подтип, ни посредством модуляции метаботропных mGluII глутаматергических рецепторов.

Серотониновые рецепторы также участвуют в регуляции судорожных порогов, а препараты с серотонергическим механизмом действия, например, флуоксетин и сертралин, снижают выраженность судорожных реакций. Однако сведения о влиянии серотонергической системы на судорожную активность мозга, несмотря на множество работ, остаются противоречивыми. С одной стороны, постулируется, что увеличение концентрации серотонина (5-НТ) в синаптической щели, вызванное ингибиторами обратного захвата серотонина

(СИОЗ) или в ЦНС, вызванное за счет введения большего количества триптофана в рацион, вызывает ослабление судорог, а дефицит нейромедиатора приводит к снижению судорожного порога [31]. С другой стороны, прижизненные и постмортум (*postmortem*) исследования в тканях мозга пациентов эпилепсией выявили усиление метаболизма серотонина в эпилептических зонах мозга [32–34]. Известно, что значительная часть возбуждающих пирамидных нейронов коры экспрессирует 5-НТ_{2A}-рецептор, который, в свою очередь, оказывает возбуждающее действие на экспрессирующие его клетки, усиливая глутаматергические спонтанные возбуждающие постсинаптические токи (EPSC). В тоже время активация 5-НТ_{2A}-рецепторов, расположенных на интернейронах ГАМК в голубом пятне (Locus Coeruleus, LC), снижает скорость возбуждения нейронов дорсального ядра шва (DRN) и их корковых проекций. Такое же облегчение ГАМКергического ингибирования, за счет увеличения частоты и амплитуды спонтанных тормозных постсинаптических токов (sIPSC), было продемонстрировано в миндалиновидном теле и гиппокампе [35]. В нашем исследовании количественные и качественные характеристики связывания 5-НТ_{2A}-рецепторов измеренные во фронтальной коре крыс не изменялись ни после однократного нанесения МЭШ, ни после введения ГИЖ-298. Возможно, для видимого изменения субъединичного состава серотонергических рецепторов на мембране 5 мин после однократного нанесения МЭШ недостаточно, в отличие от NMDAR, которые встраиваются в мембрану из депо глутаматных рецепторов при участии транспортных белков (миозины 5 и 6) быстро (в течение 30–60 с). Интернализация 5-НТ_{2A}-рецепторов осуществляется в течение 10 мин, а для их рециркуляции на клеточную поверхность требуется около 2.5 ч [36]. А возможно функциональная активность 5-НТ_{2A}-рецепторов в коре не играет существенной роли в модуляции судорожных реакций, вызванных МЭШ, у животных.

Дофаминергическая система также принимает участие в регуляции глутаматергической синаптической нейротрансмиттерной передачи. NMDA-опосредуемая

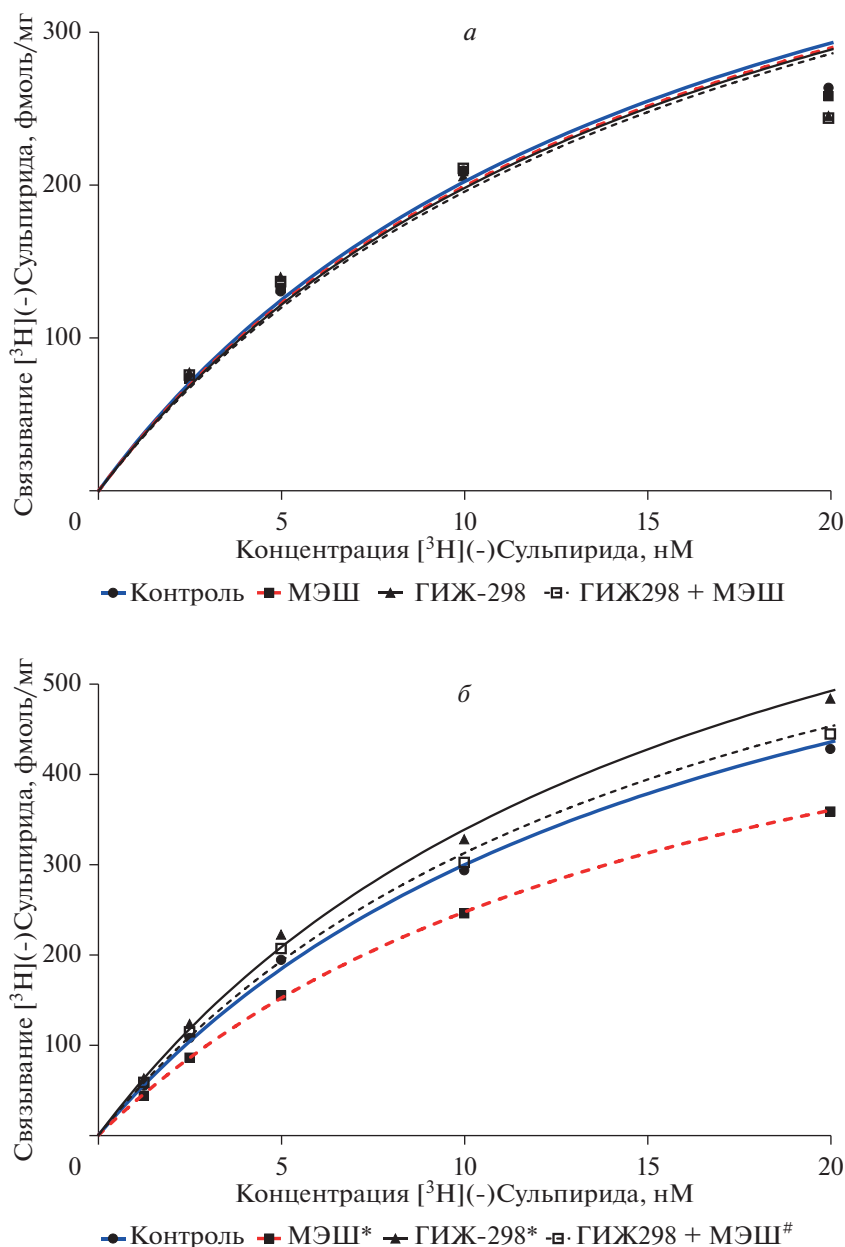


Рис. 1. Характеристики связывания $[^3\text{H}](-)\text{-sulpiride}$ с D_2 -рецепторами коры (а) и стриатума (б) мышей под влиянием введения ГИЖ-298 на фоне МЭШ (5 дней) модели. Примечание. * $p < 0.05$ статистически значимое отличие от контрольной группы, # < 0.05 статистически значимое отличие от группы МЭШ (t -критерий Стьюдента).

нейротрансмиссия регулируется D_2 и D_1 рецепторами. В тканях мозга передача сигналов от D_1 -подобных рецепторов будет стимулировать активность NMDAR и является “проэпилептогенной”, тогда как передача сигналов от D_2 -подобных рецепторов оказывает “антиэпилептогенное” действие [5, 9, 37]. В экспериментах на мышах с субхроническим (5 дней) нанесением МЭШ было выявлено значительное уменьшение количества D_2 -рецепторов в стриатуме без изменения их плотности во фронтальной коре, что, возможно, свидетельствует

о высокой вовлеченности стриатума в процессы эпилептогенеза. Известно, что в стриатуме выявляется одна из самых высоких концентраций D_2 -рецепторов, тесно колокализованных с D_1 -рецепторами на ингибиторных ГАМК-ергических нейронах, составляющих 95% клеток человека стриатума [38]. Дисбаланс D_2/D_1 рецепторов в лимбических структурах приводит к ослаблению торможения возбуждающих сигналов и, как следствие, к повышенной нейрональной возбудимости, что отмечается как у больных эпилепсией, так и у модельных живот-

ных [39–45]. В нашем исследовании ГИЖ-298 защищает от развития судорожных реакций у мышей, вызванных субхроническим нанесением МЭШ, полностью устраняя клонические проявления и тоническую экстензию конечностей, и препятствует снижению количества D_2 -рецепторов в стриатуме. Более того, ГИЖ-298 достоверно увеличивает плотность D_2 -рецепторов в данной структуре у интактных животных без МЭШ. Полученные результаты демонстрируют вовлеченность D_2 -рецепторов стриатума в механизм противосудорожного действия ГИЖ-298 и согласуются с работами, подтверждающими применение позитивных модуляторов D_2 -рецепторов для снижения выраженности судорожных реакций [7–9]. Среди известных противоэпилептических препаратов подобным механизмом действия обладает фенитоин [46].

Таким образом, в ходе экспериментальной работы установлено, что одним из компонентов механизма противосудорожного действия ГИЖ-298 является регуляция D_2 -рецепторов стриатума, что согласуется с полученными нами ранее данными о вовлечении чрезмерной функциональной активности дофаминергической системы данной структуры в судорожных реакциях и защитному противодействующему эффекту ГИЖ-298 [16].

ВЫВОДЫ

1 ГИЖ-298 защищает от развития судорожных реакций у мышей и крыс, вызванных МЭШ, устраняя тоническую экстензию конечностей.

2 Судороги, вызванные однократным воздействием МЭШ через корнеальные электроды, изменяют баланс глутаматных рецепторов в мозге: увеличивается плотность NMDA-рецепторов в гиппокампе и снижается количество mGluII рецепторов во фронтальной коре.

3. ГИЖ-298 не влияет на измененные количественные и качественные характеристики исследуемых глутаматергических рецепторов в мозге крыс, подвергнутых однократному воздействию МЭШ.

4. Судороги, вызванные субхроническим воздействием МЭШ (5 дн), вызывают снижение количества D_2 -рецепторов в стриатуме мышей.

5. ГИЖ-298 препятствует МЭШ – индуцированному снижению плотности D_2 -рецепторов в стриатуме и способствует их увеличению в данной структуре у интактных животных без МЭШ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Госпрограммой № FGFG-2022-0004.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (Протокол № 1 комиссии по биомедицинской этике от 21 января 2021 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Celli R., Fornai F. // Curr. Neuropharmacol. 2021. V. 19. № 6. P. 747–765.
2. Alexander G.M., Godwin D.W. // Epilepsy Research. 2006. V. 71. P. 1–22.
3. Nateri A.S., Raivich G., Gebhardt C., Da Costa C., Nannemann H., Vreugdenhil M., Makwana M., Brandner S., Adams R.H., Jefferys J.G., Kann O., Behrens A. // The EMBO Journal. 2007. V. 26. P. 4891–4901.
4. Doyle S., Pyndiah S., De Gois S., Erickson J.D. // The Journal of Biological Chemistry. 2010. V. 285. P. 14366–14376.
5. Gangarossa G., Di Benedetto M., O'Sullivan G.J., Dunleavy M., Alcacer C., Bonito-Oliva A., Henshall D.C., Waddington J.L., Valjent E., Fisone G. // PLoS One. 2011. V. 6. e19415.
6. Gangarossa G., Castell L., Castro L., Tarot P., Veyrune F., Vincent P., Bertaso F., Valjent E. // Journal of Neurochemistry. 2019. V. 151. P. 204–226.
7. Glazova M.V., Nikitina L.S., Hudik K.A., Kirillova O.D., Dorofeeva N.A., Korotkov A.A., Chernigovskaya E.V. // Journal of Neurochemistry. 2015. V. 132. P. 218–229.
8. Jiang W., Van Cleemput J., Sheerin A.H., Ji S.P., Zhang Y., Saucier D.M., Corcoran M.E., Zhang X. // Journal of Neuroscience Research. 2005. V. 81. P. 581–588.
9. Bozzi Y., Borrelli E. // Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013. V. 7. P. 157.
10. Aghajanian G.K., Marek G.J. // Brain Res. 1999. V. 825 (1–2). P. 161–71.
11. Celada P., Puig M.V., Artigas F. // Frontiers in Integrative Neuroscience. 2013. V. 7. Article 25.
12. Crunelli V. et al. // Xjenza Online. 2017. V. 5. P. 3–14.
13. Crunelli V., Di Giovanni G. // CNS Neurosci. Ther. 2021. V. 12. P. 967–970.
14. Жмуренко Л.А., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Неробкова Л.Н., Гайдуков И.О., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. 2018. Т. 52. № 1. С. 19–28.
15. Gaydukov I.O., Voronina T.A., Litvinova S.A., Kutepova I.S. // Medicinal Chemistry Research. 2020. V. 29. P. 783–792.
16. Литвинова С.А., Наркевич В.Б., Гайдуков И.О., Кудрин В.С., Воронина Т.А. // Нейрохимия. 2019. Т. 36. № 3. С. 239–245.
17. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. ФГБУ “НЦЭМСП”. М.: Гриф и К, 2012. Глава 14. С. 235–250.
18. Leysen J.E., Niemegeers C.J. // Mol. Pharmacol. 1982. V. 21. № 2. P. 301–14.
19. Zhou L.M., Gu Z.Q., Costa A.M., Yamada K.A., Mansson P.E. // J. Farm. Exp. Ter. 1997. V. 280(1). P. 422–427.

20. LaPage K.T., Ishmael J.E., Low C.W., Traynelis S.F., Murray T.F. // *Neuropharm.* 2005. V. 49. P. 1–16.
21. Schaffhauser H., Richards J.G., Cartmell J., et al. // *Mol. Pharmacol.* 1998. V. 53. P. 228–233.
22. Sun W., Ginovart N., Ko F., Seeman P., Kapur S. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 63. № 2. P. 456–462.
23. Naylor D.E., Liu H., Niquet J., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2013. V. 54. P. 225–238.
24. Jaideep Kapur. // *Epilepsia Open.* 2018. V. 3. P. 165–168.
25. Garrido-Sanabria E.R., Ojalora L.F., Arshadmansab M.F., Herrera B., Francisco S., Ermolinsky B.S. // *Brain Res.* 2008. V. 13. P. 165–176.
26. Watanabe Y., Kaida Y., Fukuhara S., Takechi K., Uehara T., Kamei C. // *Epilepsia.* 2011. V. 52. P. 140–150.
27. Doherty J.J., Alagarsamy S., Bough K.J., Conn P.J., Dingle-dine R., Mott D.D. // *J. Physiol.* 2004. V. 2. P. 395–401.
28. Bocchio M., Lukacs I.P., Stacey R., Plaha P., Apostolopoulos V., Livermore L., Sen A., Anson O., Gillies M.J., Somogyi P., Capogna M. // *Front. Cell Neurosci.* 2018. V. 12. P. 508.
29. Mather G.W., Pretorius J.K., Kornblum H.I., et al. // *Brain.* 1997. V. 120. P. 1937–1959.
30. Mather G.W., Pretorius J.K., Mendoza D., et al. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998. V. 57. P. 615–634.
31. Bagdy G., Kecskemeti V., Riba P., Jakus R. // *J. Neurochem.* 2007. V. 100. № 5. P. 857–873.
32. Asano E., Chugani D.C., Muzik O., Shen C., Juhasz C., Janisse J., Ager J., Canady A., Shah J.R., Shah A.K., Watxon C., Chugani H.T. // *Neurology.* 2000. V. 54. P. 1976–1984.
33. Fedi M., Reutens D., Okazawa H., Andermann F., Boling W., Dubeau F., White C., Nakai A., Gross D.W., Andermann E., Diksic M. // *Neurology.* 2001. V. 57. P. 1629–1636.
34. Chugani D.C. // *Biomark. Med.* 2011. V. 5. № 5. P. 567–575.
35. Jiang X., Xing G., Yang C., Verma A., Zhang L. & Li H. // *Neuropsychopharmacology.* 2009. V. 34. P. 410–423.
36. Raote I., Bhattacharya A., Panicker M.M. // In *Chatto-padhyay A.*, editor. *Serotonin Receptors in Neurobiology.* CRC Press/Taylor & Francis. 2007. Chapter 6.
37. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. // *Pharmacological Reviews.* 2011. V. 63. P. 182–217.
38. Lalchandani R.R., van der Goes M.S., Partridge J.G., Vicini S. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. P. 14075–14086.
39. Landvogt C., Buchholz H.G., Bernedo V., Schreckenberger M., Werhahn K.J. // *Epilepsia.* 2010. V. 51. P. 1699–1706.
40. Yakushev I.Y., Dupont E., Buchholz H.-G., Tillmanns J., Debus F., Cumming P., Heimann A., Fellgiebel A., Luhmann H.J., Landvogt C., Werhahn K.J., Schreckenberger M., Potschka H., Bartenstein P. // *Epilepsia.* 2010. V. 51. P. 415–422.
41. Rocha L., Alonso-Vanegas M., Villeda-Hernández J., Mújica M., Cisneros-Franco J.M., López-Gómez M., Zavala-Tecuapetla C., Frías-Soria C.L., Segovia-Vila J., Borsodi A. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 45. P. 499–507.
42. Bernedo Paredes V.E., Buchholz H.G., Gartenschläger M., Breimhorst M., Schreckenberger M., Werhahn K.J. // *PLoS One.* 2015. V. 10. e0141098.
43. Dorofeeva N.A., Grigorieva Y.S., Nikitina L.S., Lavrova E.A., Nasluzova E.V., Glazova M.V., Chernigovskaya E.V. // *Neurological Research.* 2017. V. 39. P. 918–925.
44. Strome E.M., Zis A.P., Doudet D.J. // *J. Psychiatry Neurosci.* 2007. V. 32. P. 193–202.
45. Landau A.M., Chakravarty M.M., Clark C.M., Zis A.P., Doudet D.J. // *Neuropsychopharmacology.* 2011. V. 36. P. 511–518.
46. Khan T.A., Momin W.M., Phadke A.G. // *Journal of Contemporary Medicine and Dentistry.* 2014. V. 2. P. 29–32.

Participation of Brain Receptors in the Mechanism of Anticonvulsant Action of a New 4-Benzoylpyridine Oxime Derivative GIZH-298

S. A. Litvinova^a, E. V. Kondrakhin^a, T. A. Voronina^a, E. V. Vasilyeva^a, and G. I. Kovalev^a

^aFSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow Russia

The aim of the work was to study the involvement of glutamate, dopamine and serotonin receptors in the mechanism of the anticonvulsant action of the 4-benzoylpyridine oxime derivative (GIZh-298). After a single exposure to the cornea with maximum electric shock (MES) and subsequent tonic-clonic seizures, an increase in the density (Bmax) of NMDA receptors in the hippocampus by 27% and a decrease in the number of mGluII receptors (mGluR2/3) by 25% in the prefrontal cortex of the brain of rats are noted. At the same time, the number of 5-HT2A receptors in the prefrontal cortex did not change. GIZh-298 (60 mg/kg) with a single application inhibits convulsive reactions, but does not affect the quantitative changes induced by MES in glutamate receptors and does not affect them under normal conditions, without MES. In tests on mice, subchronic (5 days) corneal exposure to MES reduced the density (Bmax) of D2 receptors in the striatum by 17% and did not change this parameter in the prefrontal cortex. GIZh-298 (60 mg/kg/5 days) eliminates clonic-tonic convulsions in mice and prevents a decrease in the number of D₂ receptors from striatal membranes, and also increases their number by 13% in mice without MES in the same structure. The data obtained indicate significant changes in the functional activity of NMDA, mGluII and D2 receptors in the brains of animals that suffered seizures. The anticonvulsant effects of GIZH-298 are accompanied by the restoration of the number of D₂ receptors in the striatum.

Keywords: epilepsy, GIZh-298, 4-benzoylpyridine oxime derivatives, maximum electroshock, D₂ receptors, radioligand method, receptor binding

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577

РОЛЬ МОНОАМИНОВ МОЗГА В ФОРМИРОВАНИИ АУДИОГЕННЫХ МИОКЛОНИЧЕСКИХ СУДОРОГ У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ

© 2023 г. С. А. Литвинова^{1, *}, Т. А. Воронина¹, В. С. Кудрин¹, В. Б. Наркевич¹, Н. М. Сурина², И. И. Полетаева², И. Б. Федотова²

¹ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”, Москва, Россия

²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.05.2022 г.

После доработки 19.09.2022 г.

Принята к публикации 23.09.2022 г.

Опыты проведены на крысах линии Крушинского–Молодкиной (КМ) без звуковой стимуляции (группа КМ-фон) и после выработки у них аудиогенного киндинга (АуК) (группа КМ-АуК). Контрольной группой служили крысы линии “0”, у которых судороги в ответ на звук полностью отсутствовали. АуК вырабатывали с помощью 20-кратных звуковых стимуляций (120 дБ). Нейрохимический анализ проводили методом ВЭЖХ/ЭД во фронтальной коре, гиппокампе, гипоталамусе, стриатуме, прилежащем ядре, стволе мозга. Показано, что у крыс линии КМ АуК приводит к появлению миоклонических и ослаблению интенсивности генерализованных судорожных припадков, что сопровождается изменением функциональной активности норадренергической и серотонергической систем мозга. У крыс КМ в фоне (без действия звука и развития судорог) отмечается низкое содержание норадреналина в гиппокампе и гипоталамусе, а при выработке АуК дефицит норадреналина наблюдается во фронтальной коре. После формирования АуК более интенсивный, чем у крыс линии “0”, метаболизм серотонина, выявленный у КМ, замедляется в гиппокампе, прилежащем ядре и, особенно, в стволе мозга, а также исчезает дефицит серотонина в стриатуме. Особенности обмена норадреналина у крыс КМ до и после АуК подчеркивают важную роль коры в развитии миоклонических судорог, а также возможное участие гиппокампа и гипоталамуса в реализации тонико-клонических судорожных припадков. Высокая функциональная активность серотонергической системы, выявленная у крыс КМ в ряде структур мозга в фоне, при выработке АуК ослабевает. Полученные результаты демонстрируют и подтверждают значимую роль дисбаланса моноаминов мозга в генезе эпилептиформных судорожных припадков у крыс линии КМ с генетически детерминированной аудиогенной эпилепсией и при выработке у них АуК.

Ключевые слова: крысы, линия Крушинского–Молодкиной, аудиогенная эпилепсия, аудиогенный киндинг, нейротрансмиттеры, норадреналин, серотонин, структуры мозга

DOI: 10.31857/S1027813323010132, **EDN:** EQRAQU

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных подходов к изучению патофизиологических механизмов эпилептиформных состояний являются генетические модели эпилепсии, к числу которых относится аудиогенная эпилепсия (АЭ). Известно, что около 15–20% особей лабораторных аутбредных линий крыс (например, Спрегг-Дули, некоторые стоки Вистар) реагируют на громкий звук сильным двигательным возбуждением (так называемым “клоническим бегом”), которое часто переходит в эпилептиформный судорожный припадок с клонической и, иногда, тонической фазами. В конце 1940 гг.

Л.В. Крушинский, Л.Н. Молодкина и Д.А. Флесс (биолого-почвенный факультет МГУ) начали селекцию крыс Вистар на проявление АЭ – скрещивали между собой животных, у которых в ответ на сильный звук развивался эпилептиформный припадок [1, 2]. К середине 1950 гг. линия была сформирована, и позднее ей дали название “линия крыс Крушинского–Молодкиной” (КМ). В последующий период времени, в ходе поддержания и селекции крыс этой линии интенсивность эпилептиформного припадка АЭ крыс КМ постепенно повышалась, а к 1996 г. линия была переведена в инбредное состояние с почти 100% проявлением этого признака [3]. В 1990–2000 гг. для крыс КМ были получены нейрохимические данные о содержании нейротрансмиттерных моноаминов

* Адресат для корреспонденции: 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8; тел. (495) 601-21-14; e-mail: sa_litvinova@mail.ru.

и аминокислот, а также их метаболитов в структурах мозга, как в состоянии покоя, так и на пике судорожного припадка после однократной экспозиции действию звука [4, 5]. В линиях, предрасположенных к АЭ, КМ, GEPR (Genetic Epilepsy-Prone Rats, США) и WAR (Wistar Audiogenic Rats, Бразилия), ежедневная экспозиция животных действию звука в течение 10–20 дней приводит к появлению миоклонических судорог (феномен “аудиогенного киндлинга” АуК) с небольшим снижением интенсивности тонических судорог [6, 7]. Этот тип судорог рассматривают как модель височной формы эпилепсии человека. АуК проявляется в виде коротких клонических судорог лицевой мускулатуры, мышц шеи и передних конечностей. Установлено, что в развитии собственно судорожного припадка АЭ ключевыми являются структуры ствола мозга, а формирование АуК происходит в структурах переднего мозга — в новой коре и гиппокампе [1, 8–12].

Важно отметить, что в приведенных выше исследованиях уровни нейротрансмиттеров в структурах мозга крыс линии КМ сопоставляли с таковыми аутбредной линии Вистар, на основе которой проводили селекцию крыс КМ. Однако за много десятков поколений разведения крыс КМ и крыс Вистар (с конца 1940 гг.) в обеих линиях могло произойти большое число мутационных изменений, в силу чего такое сравнение может быть малоинформативным. Это обстоятельство послужило основанием для проведения селекции крыс на отсутствие судорожного припадка АЭ, т.е. на создание линии крыс, обозначенной как “0” [13]. Исходной популяцией для этого селекционного эксперимента послужили гибриды F2 КМ × Вистар. Для получения гибридов F1 были выбраны крысы Вистар (питомник “Столбовая”), не проявлявшие никаких признаков АЭ при трехкратной экспозиции звука с интервалом в 5–7 дней. В линии “0” доля крыс (в возрасте 3–4 мес.), не обнаруживающих судорог АЭ при трехкратном применении звука с интервалом в 5 дней, колеблется от 20 до 60% [13].

Исследование спектра нейрохимических показателей содержания моноаминов в структурах мозга крыс КМ в сравнении с показателями крыс линии “0”, так же, как и изучение влияния на данные параметры аудиогенного киндлинга у крыс КМ ранее не проводилось.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение содержания нейротрансмиттерных моноаминов, в также их метаболитов в структурах мозга крыс КМ после развития АуК в сопоставлении с показателями крыс линии “0”, не предрасположенных к АЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Эксперименты проводили на крысах линии Крушинского–Мо-

лодкиной (КМ) в возрасте 5 мес. с максимальной выраженностью судорог аудиогенной эпилепсии (АЭ) у 100% животных и крысах линии “0” в возрасте 5 мес., у которых судороги в ответ на звуковой раздражитель полностью отсутствовали. Животные были получены из лаборатории физиологии и генетики поведения (биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва), где проводится селекция и поддержание данных линий. Для целей настоящего эксперимента животных содержали в условиях лабораторного вивария ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму в соответствии с ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными” от 01 июля 2016 г.

Согласно лабораторному протоколу, в возрасте 3 месяцев крыс КМ подвергали звуковому воздействию, чтобы определить у них наличие АЭ (тестировали только один раз). Крысы линии “0” экспонировались действию звука 3 раза (с интервалом в 7–8 дней) в возрасте 2–3 месяца и в эксперимент отбирались только животные, не проявившие признаков АЭ все 3 раза.

Формирование аудиогенных миоклонических судорог (аудиогенного киндлинга, АуК). Экспозицию действию звука у крыс КМ проводили в 5 мес. возрасте в пластиковой звукоизолирующей камере размерами 30 × 55 × 45 см (фирма Open Science, www.openscience.ru) (аудиторный звонок, сила звука 120 дБ). Через 3–4 с после включения звука у крыс КМ развивалось двигательное возбуждение (“клонический бег”), переходящее, к 7–8 с действия звука, в клонико-тонический судорожный припадок. Через 20 дней ежедневных экспозиций действию звука для формирования аудиогенного киндлинга у всех крыс КМ ослаблялись тонические судороги с параллельным развитием аудиогенного миоклонуса (АуК).

Животные были разделены на группы:

1. “КМ-фон” без звуковой стимуляции непосредственно перед опытом (без АуК) ($n = 8$).
2. “КМ-АуК” через 7 дней после последней экспозиции действию звука в серии из 20 ежедневных ($n = 9$).
3. Группа крыс линии “0” (без звуковой стимуляции непосредственно перед опытом) ($n = 8$).

Нейрохимические методы исследования. Для определения содержания моноаминов в структурах мозга животных декапитировали с помощью гильотины (Open Science, Россия), группу крыс КМ-АуК — через 7 дней после последней экспозиции действию звука. Структуры мозга всех крыс (фронтальная кора, гипоталамус, прилежащее ядро, стриатум, гиппокамп и ствол) извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и взвешивали. Пробы хранили в жидком азоте. Для определения содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в гомогенизаторе Поттера (тефлон-

стекло) в 1 мл 0.1 н HClO_4 с добавлением 3,4-диоксибензиламина (0.5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Определяли содержание ((нейротрансмиттеров -)) норадреналина (НА), дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и 5-оксииндоуксусной кислоты (5-ОИУК) (наномоль/грамм ткани). Использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД, хроматограф LC-304T, BAS, США с аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS, C18, 100 × 4 мм, 3 мкм, Dr. Maisch, Германия). Скорость элюции подвижной фазы была 1.0 мл/мин, давление до 200 атм. Подвижная фаза состояла из: 0.1 М цитратно-фосфатного буфера, содержащего 1.1 мМ октансульфоновой кислоты, 0.1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3.0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4В (BAS США) на двойном стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Регистрация образцов проводилась с помощью аппаратно-программного комплекса "Мультихром 1.5" ("Амперсенд"). Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: "ос. ч." или "analytical grade".

Обработку данных по содержанию моноаминов проводили следующим образом. Соответствие массива данных нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных отклонений. Данные обрабатывали с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Крускалу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Во всех случаях использовали двухсторонний критерий при критическом уровне значимости $\alpha = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание норадреналина (НА). Во фронтальной коре и прилежащем ядре содержание НА в группе крыс КМ-фон (т.е. в отсутствие выработанных миоклонических судорог) и у крыс линии "0" (нечувствительных к действию звука) практически не различалось. Однако во фронтальной коре группы КМ-АуК содержание НА было достоверно ниже, чем у КМ-фон ($p < 0.001$) и чем у крыс линии "0" ($p < 0.05$) (табл. 1). Более низкое по сравнению с линией "0" содержание НА в группе КМ-фон отмечалось в гиппокампе ($p \leq 0.05$) и гипоталамусе ($p \leq 0.05$), тогда как в стволе мозга у обеих групп крыс КМ уровень НА был, напротив, достоверно ($p < 0.05$) выше, чем у линии "0" (табл. 1), т.е. процедура формирования АуК не повлияла на содержание НА в стволе мозга у КМ. Статистически значимых изменений в содержании НА в прилежащем ядре и стриатуме выявлено не было.

Таким образом, формирование АуК у крыс линии КМ в результате многократных звуковых экс-

позиций сопровождалось снижением содержания НА во фронтальной коре, тогда как в группе крыс КМ-фон (не подвергавшихся процедуре АуК) низкие значения уровня НА отмечались в гиппокампе и гипоталамусе.

Содержание дофамина (ДА). Статистически значимых изменений содержания ДА во всех исследованных структурах мозга всех трех групп крыс не наблюдалось, отмечено лишь недостоверное увеличение этого параметра в гипоталамусе крыс КМ-АуК (табл. 1). Вместе с тем, в содержании метаболитов ДА был выявлен ряд отличий, которые отражали изменение интенсивности внутриклеточного обмена – в гипоталамусе отмечено более высокое содержание ДОФУК у КМ, по сравнению с линией "0", причем для группы КМ-фон оно было достоверно выше ($p < 0.05$). Содержание ГВК, являющееся показателем скорости внеклеточного метаболизма ДА, в гиппокампе было достоверно ($p < 0.05$) ниже у группы КМ-фон по сравнению с линией "0". У группы КМ-АуК внеклеточный оборот ДА был несколько выше, чем у группы КМ-фон, о чем может свидетельствовать более высокое содержание ГВК в прилежащем ядре (отличие КМ-АуК vs КМ-фон достоверно, $p < 0.05$) и в стриатуме (отличие КМ-АуК vs "0" достоверно, $p < 0.05$) (табл. 1).

Содержание серотонина и его метаболитов. Содержание серотонина (5-ОТ) во фронтальной коре у обеих групп КМ было достоверно ($p < 0.05$) выше, чем у крыс линии "0". В стриатуме у группы КМ-фон этот показатель был достоверно ниже, чем у линии "0", тогда как у КМ-АуК он был равен таковому линии "0", при этом отличия от КМ-фон были недостоверны. В стволе мозга крыс группы КМ-АуК содержание 5-ОТ было достоверно ($p < 0.05$) ниже, чем у КМ-фон, тогда как различия между линиями "0" и КМ-фон были недостоверными.

Содержание 5-ОИУК (метаболита 5-ОТ), являющимся показателем скорости утилизации 5-ОТ, у крыс группы КМ-фон было выше, чем у крыс линии "0" в таких структурах мозга, как фронтальная кора, прилежащее ядро, гиппокамп и ствол. Отношение 5-ОИУК/5-ОТ (показатель утилизации 5-ОТ) во всех исследованных структурах мозга крыс группы КМ-фон было значительно выше, чем у крыс линии "0". В данной группе особенно интенсивный оборот серотонина отмечался в стволе мозга, где наблюдалось также и более высокое содержание 5-ОТ по сравнению с линией "0" (табл. 2).

В группе крыс КМ-АуК отмечалось снижение интенсивности оборота серотонина относительно группы КМ-фон во всех структурах (кроме гипоталамуса) мозга, не достигшее, однако, уровня достоверности. Тем не менее, в данной группе статистическая значимость по величине отношения 5-ОИУК/5-ОТ при сравнении с крысами линии "0" сохранялась только в гипоталамусе, стриатуме и стволе мозга. Обнаруженное более низкое содержание 5-ОТ в стволе мозга у крыс КМ-АуК (по сравнению с КМ-фон), возможно, причинно

Таблица 1. Содержание катехоламинов и их метаболитов (нмоль/г ткани) в структурах мозга крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) до и после аудиогенного киндлинга (АуК) в сравнении с линией “0”

Фронтальная кора						
Группа	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА
“0”	1.49 ± 0.09	0.5 ± 0.10	0.11 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.10 ± 0.07
КМ-фон	1.50 ± 0.22@@	0.46 ± 0.12	0.11 ± 0.11	0.03 ± 0.03	0.27 ± 0.10	0.07 ± 0.06
КМ-АуК	1.28 ± 0.10**	0.57 ± 0.11	0.10 ± 0.05	0.04 ± 0.047	0.19 ± 0.06	0.09 ± 0.06
Гипоталамус						
Группа	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА
“0”	7.31 ± 1.26	1.61 ± 0.27	0.17 ± 0.05	0.11 ± 0.16	0.10 ± 0.03	0.06 ± 0.08
КМ-фон	5.93 ± 1.15*@@@	1.48 ± 0.38	0.24 ± 0.09	0.06 ± 0.07	0.17 ± 0.01*	0.05 ± 0.06
КМ-АуК	8.52 ± 0.38	1.97 ± 0.12	0.29 ± 0.04*	0.13 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Прилежащее ядро						
Группа	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА
“0”	5.89 ± 1.38	28.90 ± 4.00	2.83 ± 0.68	2.46 ± 0.72	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02
КМ-фон	5.85 ± 2.33	29.05 ± 8.56	2.75 ± 0.79	2.53 ± 0.54	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.03
КМ-АуК	4.42 ± 1.16	31.95 ± 7.45	3.30 ± 0.98	3.19 ± 0.67	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.03
Стриатум						
Группа	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА
“0”	0.61 ± 0.31	93.59 ± 7.32	12.34 ± 1.59	4.35 ± 0.77	0.13 ± 0.01	0.05 ± 0.01
КМ-фон	0.43 ± 0.17	87.67 ± 14.07	11.67 ± 2.24	4.62 ± 0.88	0.13 ± 0.01	0.05 ± 0.01
КМ-АуК	0.47 ± 0.24	92.14 ± 8.99	11.60 ± 1.12	5.50 ± 1.27	0.13 ± 0.01	0.06 ± 0.01*
Гиппокамп						
Группа	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА
“0”	2.10 ± 0.23	0.31 ± 0.14	0.10 ± 0.04	0.109 ± 0.05	0.52 ± 0.19	0.91 ± 0.35
КМ-фон	1.81 ± 0.15**@@	0.13 ± 0.16	0.06 ± 0.05	0.051 ± 0.04	0.362 ± 0.26	0.36 ± 0.10
КМ-АуК	2.10 ± 0.19	0.19 ± 0.12	0.10 ± 0.05	0.068 ± 0.08	0.72 ± 0.70	0.57 ± 0.76
Столб мозга						
Группа	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА
“0”	2.13 ± 0.29	0.81 ± 0.30	0.18 ± 0.09	0.04 ± 0.08	0.22 ± 0.07	0.09 ± 0.19
КМ-фон	2.74 ± 0.60*	0.83 ± 0.24	0.22 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.288 ± 0.091@	0.04 ± 0.02
КМ-АуК	2.75 ± 0.55*	1.19 ± 0.55	0.24 ± 0.14	0.03 ± 0.03	0.195 ± 0.03	0.03 ± 0.02

Примечания: КМ-фон – крысы КМ без звуковой стимуляции; КМ-АуК – крысы КМ с аудиогенным киндлингом; “0” – контрольные крысы; *, **, *** – отличие от крыс линии “0”, различия достоверны при $p \leq 0.05$, 0.01 и 0.001 соответственно; @, @@ – отличие от КМ-АуК, различия достоверны при $p \leq 0.05$ и 0.01 соответственно (Крускал–Уоллиса с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну).

связано с более низкими значениями показателя оборота 5-ОТ в данных структурах (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано ранее, у крыс линии КМ наблюдаемые тонико-клонические судороги при воздействии акустического раздражителя начинаются “диким бегом” и завершаются тоническим судорожным припадком с экстензией конечностей [14]. Аудиогенный киндлинг (АуК) у крыс КМ, так же как и у крыс других линий с АЭ (GEPR и WAR), представляет собой появление новых по своей форме судорог – миоклонических, проявляющихся как короткие “тикообразные” подер-

гивания мышц морды и передних конечностей [14], что было продемонстрировано и в данном исследовании. Появление миоклонических судорог сопровождается некоторым ослаблением интенсивности тонических судорог (у крыс линии КМ проявляющимся нерегулярно) [8, 10–12].

Как было показано в настоящем исследовании, АуК в наибольшей степени оказывал влияние на содержание норадреналина (НА) и серотонина (5-ОТ) в мозге крыс КМ. В ряде исследований было показано, что НА можно рассматривать как ингибитор судорожной активности, и при многих моделях эпилепсии обнаруживают его дефицит [15–18]. Установлено, что функциональная активность норадренергической системы игра-

Таблица 2. Содержание серотонина и его метаболитов (нмоль/г ткани) в структурах мозга крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) до и после аудиогенного киндлинга (АуК) в сравнении с линией “0”

Группа	5-ОТ	5-ОИУК	5-ОИУК/5-ОТ
Фронтальная кора			
“0”	2.92 ± 0.48	3.07 ± 0.53	1.01 ± 0.13
КМ-фон	3.32 ± 0.27*	3.92 ± 0.62**	1.18 ± 0.16*
КМ-АуК	3.40 ± 0.39*	3.79 ± 0.59*	1.12 ± 0.15
Гипоталамус			
“0”	3.58 ± 0.87	5.42 ± 1.64	1.51 ± 0.23
КМ-фон	3.81 ± 0.99	6.81 ± 1.70	1.79 ± 0.16**
КМ-АуК	4.19 ± 0.22	7.50 ± 0.43*	1.87 ± 0.07**
Прилежащее ядро			
“0”	1.14 ± 0.26	0.73 ± 0.42	0.61 ± 0.26
КМ-фон	1.37 ± 0.55	2.06 ± 1.06**	1.31 ± 0.40**
КМ-АуК	1.25 ± 0.32	1.24 ± 0.95	0.96 ± 0.59
Стриатум			
“0”	3.58 ± 0.45	10.03 ± 1.36	2.82 ± 0.42
КМ-фон	3.13 ± 0.41**	10.25 ± 1.33	3.28 ± 0.17**
КМ-АуК	3.46 ± 0.43	11.24 ± 1.85	3.25 ± 0.34*
Гиппокамп			
“0”	1.31 ± 0.27	2.65 ± 0.81	1.88 ± 0.78
КМ-фон	1.39 ± 0.29	3.31 ± 0.62*	2.39 ± 0.21**
КМ-АуК	1.32 ± 0.54	2.99 ± 1.4	2.21 ± 0.30
Ствол мозга			
“0”	3.11 ± 1.16	4.26 ± 0.89	1.48 ± 0.39
КМ-фон	3.23 ± 0.56@	8.03 ± 2.77**@	2.43 ± 0.40***
КМ-АуК	2.44 ± 0.47	5.19 ± 0.78	2.16 ± 0.33**

Примечания: см. таблицу 1.

ет значительную роль в реализации противосудорожного действия многих противоэпилептических препаратов, эффект которых ослаблен у грызунов с дефицитом НА [17, 19]. Показано также, что противосудорожный эффект стимуляции блуждающего нерва (способа ослабления пилокарпиновых судорог), достигается за счет повышения уровня НА в гиппокампе [20, 21]. Как известно, источником норадренергической иннервации практически всех отделов мозга является ядро locus coeruleus (голубое пятно), расположенное в области моста. Роль этого ядра в генезе аудиогенной эпилепсии была показана достаточно давно [22], как и то, что феномен киндлинга, вызванного электростимуляцией миндалины, сопровождается ослаблением норадренергической нейротрансмиссии в мозге [23]. Ранее, при сопоставлении двух групп крыс с АЭ (линий GEPR-9 и GEPR-3), было установлено, что у GEPR-9 (с повышенной предрасположенностью к АЭ) норадренергическая “недостаточность” выражена сильнее, чем у GEPR-3 [24]. У крыс линии GEPR-3 формирование АуК сопровождается усилением дефицита НА в стволе мозга, в новой коре, гиппокампе, гипоталамусе и миндалине [25]. Авторы полагают, что это связано с тем, что повторные судороги при выработке АуК у крыс GEPR-3 снижают и без того низкую активность тирозингидроксилазы (фермента лимитирующего синтез НА) в locus coeruleus и в нижнем бугорке четверохолмия [26]. Однако следует также

помнить, что линии GEPR имеют иной, чем линия КМ, генетический фон.

В настоящей работе у крыс группы КМ-АуК содержание НА в гипоталамусе и гиппокампе было выше, чем у животных группы КМ-фон (практически не отличаясь по этому показателю от линии “0”). В то же время во фронтальной коре группы КМ-АуК этот показатель был достоверно ниже, чем у линии “0” и у группы КМ-фон. Это может быть одним из индикаторов участия фронтальной коры в генезе миоклонических судорог (возможно через связи этой корковой структуры с миндалиной и гиппокампом). Отметим, однако, что в стволе мозга содержание НА было выше у обеих групп КМ по сравнению с группой “0”, что, по всей видимости, не совпадает с концепцией НА как ингибитора судорожной активности, во всяком случае, для структур ствола. Ранее было показано, что снижение содержания НА в переднем мозге при амигдаллярном киндлинге значительно потенцирует развитие последнего [23, 27].

Анализ изменения показателей дофаминергической системы выявил только одно достоверное различие между двумя группами КМ – в прилежащем ядре содержание ГВК, показателя отражающего внеклеточный оборот дофамина, было достоверно выше у КМ-АуК vs КМ-фон.

Показатели метаболизма серотонина во всех структурах мозга крыс линии КМ значительно превышали таковые значения для крыс линии “0”, что

соотносится с результатами, полученными ранее при сравнении с крысами Вистар [4]. При этом во всех отделах мозга наблюдались более высокие, чем у линии “0”, величины отношения 5-ОИУК/5-ОТ (как показателя “истощения” серотонина). Однако достоверное снижение уровня серотонина отмечалось только в стриатуме крыс КМ. Аналогичная картина наблюдалась у крыс линии GEPR-9, проявляющих стволовые судороги, у которых уровень серотонина был значительно ниже в данной структуре, чем у GEPR-3, проявляющих только клонические судороги [28]. АуК приводил к некоторому изменению показателей метаболизма серотонина в структурах мозга КМ. Наблюдалось снижение его интенсификации в гиппокампе, прилежащем ядре и особенно в стволе.

Таким образом, серийное предъявление звука (120 дБ) и формирование миоэпилептических судорог у крыс линии КМ привело к развитию изменения функциональной активности норадренергических и серотонергических систем мозга. Обнаруженные различия находятся в общем русле особенностей метаболизма нейротрансмиттеров у крыс линий, предрасположенных к АЭ [22, 29–31, 12, 32], хотя могут быть и отражением повышенной судорожной готовности в целом [33]. Следует, однако, отметить, что особенности состояния нейротрансмиттерных систем мозга при судорожных состояниях в ответ на звук, по всей видимости, следует рассматривать как модуляторные факторы, поскольку в развитии аудиогенной эпилепсии ключевую роль играют глутаматергическая и ГАМК-ергическая нейротрансмиттерные системы [34–36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные в настоящем исследовании особенности обмена норадреналина у крыс КМ до и после АуК подчеркивают важную роль коры (и как минимум ее фронтальных отделов) в генезе миоэпилептических судорог, развивающихся при ритмической провокации тонических судорожных припадков, имеющих “стволовое” происхождение. Содержание норадреналина в гиппокампе и гипоталамусе может быть индикатором того, что селекция на высокую предрасположенность к аудиогенной эпилепсии повлияла на этот показатель не только в структурах ствола. Интенсификация метаболизма серотонина более выражена у крыс КМ в “фоне”, а при формировании АуК наблюдается замедление метаболизма нейротрансмиттера в гиппокампе, прилежащем ядре и особенно в стволе мозга и “фоновый” дефицит серотонина в стриатуме исчезает. Полученные в данной работе результаты, наряду с описанными ранее аномалиями в ГАМКергической и глутаматергической системах [34–36], демонстрируют и подтверждают существенную роль дисбаланса моноаминов в определении повышенной судорожной готовности крыс линии Крушинского–Молодкиной.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Госпрограммой № FGFG-2022-0004, научной программой Московского государственного университета № 121032500080-8 и Междисциплинарной научной и образовательной Школой Московского университета “Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (Протокол №1 Комиссии по биомедицинской этике от 21 января 2021 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И. // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2006. Т. 56 (3). С. 298–316.
2. Poletaeva I., Surina N., Kostina Z., Perepelkina O., Fedotova I. // Epilepsy & Behavior. 2017. V. 71. P. 130–141.
3. Семиохина А.Ф., Ратькин А.Е., Федотова И.Б., Кузнецова Л.М., Костына З.А., Сотская М.Н., Чебыкина Л.И. // Журнал высш. нерв. деят. 1996. Т. 46 (3). С. 592–596.
4. Косачева Е.С., Кудрин В.С., Федотова И.Б., Семиохина А.Ф., Раевский К.С. // Экспериментальная и клиническая Фармакология. 1998. Т. 61. № 3. С. 25–27.
5. Сорокин А.Я., Кудрин В.С., Клодт П.М., Тюомисто Л., Полетаева И.И., Раевский К.С. // Генетика. 2004. Т. 40. № 6. С. 846–849.
6. Dutra Moraes M.F., Galvis-Alonso O.Y., Garcia-Cairasco N. // Epilepsy Res. 2000. V. 39 (3). P. 251–9.
7. Полетаева И.И., Перепелкина О.В., Огиенко Н.А., Федотова И.Б., Плещачева М.Г., Кошлань И.В., Богданова Ю.В., Кошлань Н.А., Павлова Г.В., Ревущин А.В. // Биофизика. 2020. Т. 65. № 4. С. 773–779.
8. Naritoku D.K., Mecozzi L.B., Aiello M.T., Faingold C.L. // Exp Neurol. 1992. V.155. P. 317–24.
9. Ishida N., Kato N., Kanai H., Watanabe Y., Kuroda Y., McEwen B.S. // Psychiatry Clin. Neurosci. 1995. V. 49(3): S280–2.
10. Garcia-Cairasco N., Wakamatsu H., Oliveira J.A., Gomes E.L., Del Bel E.A., Mello L.E. // Epilepsy Res. 1996. V. 26. P. 177–192.
11. Romcy-Pereira R.N., Garcia-Cairasco N. // Neuroscience. 2003. V. 119 (2). P. 533–546.
12. Merrill M.A., Clough R.W., Jobe P.C., Browning R.A. // Epilepsia. 2005. V. 46 (9). P. 1380–1388.
13. Федотова И.Б., Костына З.А., Сурина Н.М., Полетаева И.И. // Генетика. 2012. Т. 48 (6). С. 685–691.
14. Полетаева И.И., Сурина Н.М., Федотова И.Б. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 6. С. 742–748.
15. Kokaia M., Cenci M.A., Elmer E., Nilsson O.G., Kokaia Z., Bengzon J., Björklund A., Lindvall O. // Exp. Neurol. 1994. V. 130 (2). P. 351–61.

16. Weinshenker D., Szot P., Miller N.S., Rust N.C., Hohmann J.G., Pyati U., White S.S., Palmiter R.D. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21(19). P. 7764–7769.
17. Weinshenker D., Szot P. // *Pharmacol. Ther.* 2002. V. 94. P. 213–233.
18. Giorgi F.S., Pizzanelli C., Biagioni F., Murri L., Fornai F. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2004. V. 28. P. 507–524.
19. Szot P., Weinshenker D., Rho J.M., Storey T.W., Schwartzkroin P.A. // *Brain research. Developmental Brain Research.* 2001. V. 129 (2). P. 211–214.
20. Meurs A., Clinckers R., Raedt R., El Tahry R., De Herdt V., Vonck K., Smolders I.J., Michotte Y., Boon P. // *Epilepsia.* 2008. V. 49(1). P. 350.
21. Raedt R., Clinckers R., Mollet L., Vonck K., El Tahry R., Wyckhuys T., De Herdt V., Carrette E., Wadman W.J., Michotte Y., Smolders I., Boon P., & Meurs A. // *Journal of Neurochemistry.* 2011. P. 117.
22. Jerlicz M., Kostowski W., Bidziński A., Hauptman M., Dymek J. // *Acta Physiol. Pol.* 1978. V. 29 (5). P. 409–412.
23. Corcoran M.E., Mason S.T. // *Brain Res.* 1980. V. 190. P. 473–484.
24. Jobe P.C., Browning R.A. // *Epilepsy & Behavior.* 2005. V. 7 (4). P. 602–619.
25. Jobe P.C., Mishra P.K., Browning R.A., Wang C., Adams-Curtis L.E., Ko K.H., Dailey J.W. // *Brain Res. Bulletin.* 1994. V. 35 (5–6). P. 493–504.
26. Ryu J.R., Shin C.Y., Park K.H., Jeon G.S., Kim H., Kim W., Dailey J.W., Jobe P.C., Cho S.S., Ko K.H. // *Brain Res. Bull.* 2000. V. 53 (6). P. 777–782.
27. Altman I.M., Corcoran M.E. // *Brain Res.* 1983. V. 270. P. 174–177.
28. Dailey J.W., Mishra P.K., Ko K.H., Penny J.E., Jobe P.C. // *Life Sci.* 1992. V. 50(4). P. 319–326.
29. Jobe P.C., Dailey J.W., Reigel C.E. // *Life Sci.* 1986. V. 39(9). P. 775–782.
30. Dailey J.W., Mishra P.K., Ko K.H., Penny J.E., Jobe P.C. *Epilepsia.* 1991 V. 32(2). P. 168–173.
31. Raisinghani M., Faingold C.L. // *Brain Res.* 2005. V. 1064(1–2). P. 90–97.
32. Petrucci A.N., Joyal K.G., Purnell B.S., Buchanan G.F. // *Exp. Neurol.* 2020. V. 325/ P. 113145.
33. De Sarro G., Russo E., Citraro R., Meldrum B.S. // *Epilepsy Behav.* 2017. V. 71 (Pt B). P. 165–173.
34. Korotkov A., Glazova M., Nikitina L., Dorofeeva N., Kirillova O., Chernigovskaya E. // *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova.* 2015. V. 101. P. 1135.
35. Solius G.M., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Poletaeva I.I. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 32–341.
36. Ribak C.E. // *Epilepsy Behav.* 2017. V. 71 (Pt B). P. 160–164.

Role of Brain Monoamines in the Formation of Audiogenic Myoclonic Seizures in Krushinsky–Molodkina Rats

S. A. Litvinova^a, T. A. Voronina^a, V. S. Kudrin^a, V. B. Narkevich^a,
N. M. Surina^b, I. I. Poletaeva^b, and I. B. Fedotova^b

^aFSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russia

^bFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The results demonstrate and confirm the significant role of monoamine imbalance in the ictogenesis of Krushinsky–Molodkina rats with genetically determined audiogenic epilepsy and in the development of audiogenic kindling (AuK) in them. The experiments were carried out on rats of the Krushinsky–Molodkina (KM) line without sound stimulation (KM-background) and after the development of AuK (KM-AuK). The control group was rats of line “0”, in which convulsions in response to sound were completely absent. AuK was generated using 20-fold sound stimulation (120 dB). Neurochemical analysis was performed by HPLC/ED in the frontal cortex, hippocampus, hypothalamus, nucleus accumbens, and brainstem. It has been established that AuK in KM rats leads to the appearance of myoclonic and attenuation of stem convulsions, which is accompanied by a change in the functional activity of the noradrenergic and serotonergic systems of the brain. KM rats exhibiting tonic convulsions in the “background” have a low content of norepinephrine in the hippocampus and hypothalamus, and when audiogenic myoclonic convulsions develop, norepinephrine deficiency is observed in the frontal cortex. After the formation of AuK, the excessively intense serotonin metabolism revealed in KM slows down in the hippocampus, nucleus accumbens, and, especially, in the brainstem, and the serotonin deficiency in the striatum also disappears. The peculiarities of norepinephrine metabolism in KM rats before and after AuK emphasize the important role of the cortex in the development of myoclonic convulsions, and of the hippocampus and hypothalamus in the implementation of stem convulsions. Excessive functional activity of the serotonergic system, revealed in KM “background” rats, slows down in a number of brain structures during the production of AuK.

Keywords: Krushinsky–Molodkina rats, audiogenic epilepsy, audiogenic kindling, neurotransmitters, norepinephrine, serotonin, brain structures

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 575.113:57.084.1

АЛЛОПАРЕНТНАЯ ЗАБОТА И ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ TRH2 ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

© 2023 г. А. А. Кибиткина¹*, Е. Р. Василевская¹, Г. С. Толмачева¹, А. М. Зубалий²

¹ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Москва, Россия

²ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Красногорск, Россия

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 15.08.2022 г.

Принята к публикации 18.08.2022 г.

Вопрос о взаимосвязи передачи негативного эффекта от матери с депрессией к потомству является одним из приоритетных в современной психиатрии. Мыши с целевым нокаутом гена TRH2 имеют депрессивно-компульсивный фенотип, что делает этих животных высокоточной биомоделью для изучения роли серотонина в организме. У потомства таких животных были изучены репродуктивные параметры: созревание детенышей (физиологическое развитие) и сенсорные и моторные рефлексы. Было установлено, что у гетерозиготных мышей по гену TRH2 снижена материнская забота и повышен каннибализм, направленный на потомство. В материнском поведении также были выявлены отклонения и нарушения в возвращении детенышей в гнездо. Некоторое отставание в развитии гетерозиготного потомства наблюдалось после 10 суток постнатального онтогенеза. Гомозиготные детеныши (KO) имели меньшую массу, чем гетерозиготные (Het) и дикого типа (Wt), тем не менее скорость отлипания ушной раковины, прорезывания верхних резцов, открытия глаз и опускания семенников у мышат KO проявлялась в те же сроки, что и у мышей Wt и Het.

Ключевые слова: серотонин мозга, триптофан гидроксилаза-2 (TRH2), детеныши мышей, двигательная функция, сенсорный рефлекс, репродукция, разведение

DOI: 10.31857/S1027813323010090, **EDN:** DUJOQJ

ВВЕДЕНИЕ

В послеродовой период организм матери претерпевает огромные физиологические и поведенческие изменения, направленные на поддержание и заботу о потомстве. Материнство является социально мотивированным поведением и предполагает пластичность многих нейромодуляторных систем мозга (серотонина (5-НТ), дофамина, гамма-аминомасляной кислоты и норадреналина). Однако прямое действие серотонина недооценивается, и в настоящее время не хватает данных, подтверждающих роль этого нейротрансмиттера на таких этапах жизни, как беременность и материнство. Вопрос о взаимосвязи передачи негативного эффекта от депрессивной матери к потомству является одним из приоритетных в современной психиатрии. Известно, что при проявлении депрессивных расстройств наблюдаются нарушения в серотонинергической иннервации. Поскольку серотонин (5-НТ) является нейромедиатором и нейромодулятором мозга, он также участвует в регуляции широкого спектра основных физиологических функ-

ций, включая процессы развития, синаптическую пластичность, метаболический гомеостаз, нейроэндокринную функцию, аппетит, затраты энергии, частоту дыхания и сон [1–4].

Распространенность депрессивных заболеваний среди беременных и послеродовых женщин составляет примерно 10–20% [2]. Часто материнская психопатология очень динамична и может протекать в субклинической форме, что затрудняет диагностику психических расстройств. Исходя из этого, возникает проблема: как можно изучать аномальное материнское поведение и последующее развитие детей? Существующие экспериментальные данные о функциональной роли серотонинергической нейромодуляции показывают большую вариабельность, в основном в концентрации 5-НТ в мозге, которая зависит от вида и времени взятия биопробы [1].

Для изучения уровня 5-НТ в мозге был разработан ряд моделей животных с мутациями в генах, участвующих в передаче 5-НТ и формировании серотонинергических нейронов. Одной из высокоточных моделей являются мыши-нокауты триптофан гидроксилазы-2 (TRH2), которая кодирует одноименный фермент и отвечает за ско-

* Адрес для корреспонденции: 109316 Москва, ул. Талалихина, д. 26, тел. +7 (495) 676-95-11 (доб. 128), e-mail: a.kibitkina@fncps.ru.

рость синтеза 5-НТ из триптофана с использованием кислорода и тетрагидробиоптерина (ВН4) в качестве субстратов и железа в качестве кофактора [5, 6]. Фермент TRH2 экспрессируется нейронами в ядре шва головного мозга и играет роль в когнитивной деятельности и проявлении обсессивно-компульсивного расстройства [7].

Поскольку необходимым условием репродуктивного успеха у млекопитающих и незаменимым компонентом выживания и развития потомства является проявление инстинкта материнской заботы, в данной работе мы рассмотрели, как фенотип TRH2-дефицитных мышей влияет на развитие постнатальных нейроповеденческих рефлексов у потомства. В настоящее время фенотипический профиль гомозиготных TRH2-нокаутных мышей с полным отсутствием серотонина в мозге изучен достаточно полно, и доказано, что отсутствие этого гена приводит к проявлению сопутствующих нарушений при депрессивном расстройстве, таких как дисбаланс эмоциональной регуляции, тревожность и импульсивность. Для гетерозиготного TRH2 также достаточно изучен молекулярный цикл серотонина в мозге, показано, что его содержание снижено на 10–20% [8, 9]. В предыдущих исследованиях поведенческий профиль гетерозиготных нокаутных TRH2 мышей был изучен недостаточно, однако были опубликованы данные, свидетельствующие о появлении у мышей повышенной импульсивности и чрезмерной агрессии в условиях стресса [9, 10]. Ранее было показано, что материнский стресс негативно влияет на развитие мозга плода, приводя к неблагоприятным когнитивным, поведенческим и психосоциальным последствиям в младенчестве и взрослом возрасте [11].

В данной работе мы рассмотрели, как частичный недостаток серотонина в мозге матери у гетерозиготных особей влияет на постнатальное развитие рефлексов у потомства, что дополнит характеристику пенетрантности гена TRH2 и расширит область применения мышей TRH2 для исследования депрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперимент проводился в Экспериментальной клинике-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения (Федеральный исследовательский центр пищевых систем им. В.М. Горбатова). Родительский штамм гетерозиготных мышей TRH2, содержащий последовательности loxP-наполнителя Cre, нацеленные на экзон 5, был получен на смешанном генетическом фоне 129 Sv и C57BL/620.28 и скрещен с чистым генетическим фоном мышей C57BL/6J в лаборатории доктора Леша в отделе молекулярной психиатрии Центра психического здоровья, Университет Вюрцбурга в мае 2019 г. (Вюрцбург, Германия) [12].

Животных содержали и тестировали со свободным доступом к пище и воде в индивидуально вентилируемых клетках Bio A.S. (Vent II, EHRET, Германия) типа 2L (размер 350 × 200 × 140 мм). Самцов мышей содержали в группах по 2–3 особи, а самок — по 4–5 особей. Условия содержания животных были стандартизированы: температура — $20 \pm 3^\circ\text{C}$, влажность — $35 \pm 2\%$, приточно-вытяжная вентиляция — $95 \pm 5 \text{ м}^3/\text{ч}$, режим освещения день/ночь с 6.00 до 18.00/с 18.00 до 6.00. В качестве подстилки использовался кукурузный наполнитель (“Золотой кот”, Россия). На протяжении всего эксперимента животные потребляли гранулированный корм для разведения лабораторных грызунов (“Лабораторкорм”, Россия).

Для изучения репродуктивной функции мышей C57BL/6J генотипа TRH2 случайным образом были отобраны гетерозиготные животные: 17 самцов и 34 самки в возрасте 12–30 недель. Количество пар для размножения рассчитывалось, исходя из размера целевой группы по 17 животных на генотип, а также на основе равновесия Харди–Вайнберга, соотношения полов 1 : 2 и предполагаемого коэффициента репродуктивного успеха 75%.

Исследование материнского поведения было проведено на 18 примипарных самках дикого типа (Wt) и 18 примипарных гетерозиготных TRH2 самках (TRH2 Het). Исследование постнатального развития проводилось на потомстве, полученном от TRH2 Het мышей ($n = 60$), с учетом генотипа: гомозиготный нокаут — TRH2 KO (TRH2^{-/-}, $n = 11$), гетерозиготный нокаут — TRH2 Het (TRH2^{+/-}, $n = 29$) и дикий тип — Wt (TRH2^{+/+}, $n = 20$). Размер помета при рождении не нормировался на количество детенышей разных генотипов, пола или общий размер помета, что связано с более высокой смертностью потомства, полученного от гетерозиготных нокаутных мышей.

Разведение. Эструс самок из групп TRH2 Het и Wt определяли визуально путем осмотра вульвы и цитологически путем микроскопического анализа вагинальных мазков по Miglierini [4] в течение 20 дней (до разведения). Вагинальный секрет отбирали с помощью автоматической пипетки (Thermo Fisher Scientific, США) после добавления физиологического раствора (0.9% NaCl) в объеме 15 мкл при температуре $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Вагинальную секрецию изучали с помощью микроскопа Axio A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 40$. Для синхронизации эструса 2 г подстилочного материала, пропитанного мочой самцов, брали из клеток самцов, отобранных для спаривания, и добавляли в домашние клетки самок согласно Auth [5]. После 72 ч воздействия феромонов и подтверждения эструса у самок их помещали в клетки самцов (гаремная группа [трио] — 1 самец и 2 самки). Для регистрации акта спаривания регистрировали наличие вагинальных пробок. После подтверждения бере-

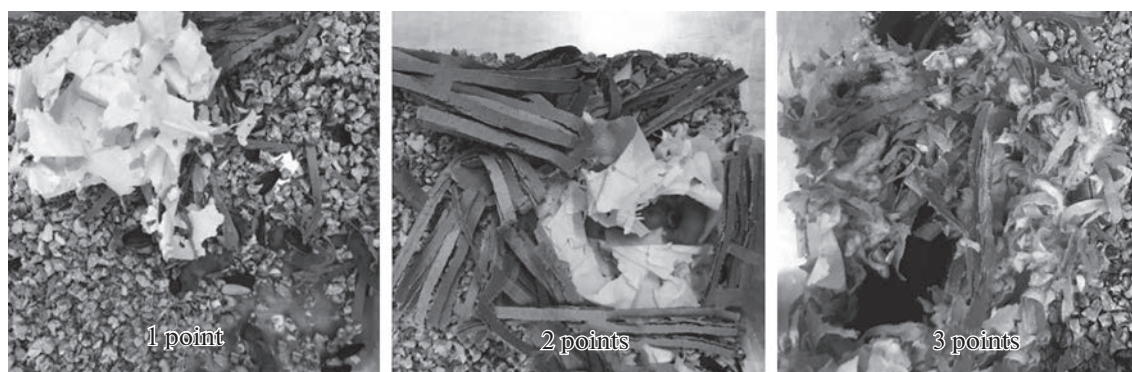


Рис. 1. Оценка гнездостроения экспериментальных мышей.

менности (примерно на 14-й день беременности, путем визуального осмотра и пальпации) самцов и самок разделили по разным клеткам [13]. Далее гнезда проверяли на наличие детенышей один раз в день. День рождения был обозначен как послеродовой день (PD0). Эффективность спаривания животных оценивалась по способности самок и самцов к оплодотворению как процентное соотношение беременных самок/плодовитых самцов к общему количеству подсаженных самок/самцов [14].

Чтобы минимизировать стресс [10], после подтверждения беременности всех самок помещали в одинаковые клетки с гнездовым материалом из измельченной бумаги и бумажных трубочек. Для минимизации каннибализма к стандартному рациону разведения ежедневно добавляли корм для беременных и кормящих собак (Royal Canin, Польша) (1 г на мыш) и нежареные семена подсолнечника (1 г на мыш).

Материнское поведение. Определение уровня материнского инстинкта оценивалось по следующим показателям: обустройство гнезда, “поисковый тест”, кормление и каннибализм.

Оценку обустройства гнезда у подопытных мышей проводили с помощью модифицированной шкалы [15, 16], разделенной на две категории для предотвращения необъективных наблюдений — оценка точки организации гнезда и измерение глубины и ширины гнезда. На PD0 использовалась 3-балльная шкала организации гнезда (рис. 1): “1” балл — материал гнезда (НМ) не тронут более чем на 70%, частично разорван; “2” балла — НМ в основном раздавлен, но не идентифицируется как гнездо, менее 50% НМ остается нетронутым, но менее 90% находится в пределах четверти площади пола клетки, НМ не собран в гнезде, а разбросан по всей клетке; “3” балла — используется более 90% НМ, и гнездо представляет собой глубокую чашу. Глубина и ширина гнезд также измерялись линейкой.

Группировку детенышей оценивали по “поисковому тесту” [17, 18], адаптированному для мы-

шей. Для этого детенышей равномерно распределяли по домашней клетке и в течение 10 минут регистрировали их возвращение самкой в гнездо. Если детеныши оставались нетронутыми самкой, материнское поведение оценивалось в “0” баллов. Если детенышей перетаскивали в одно место вне гнезда, то ставили “1” балл. Хаотичное группирование детенышей в гнезде оценивалось в “2” балла, а сгруппированные детеныши в гнезде — в “3” балла. Также регистрировалось время группировки всех детенышей из помета.

Кормление детенышей оценивали на PD2—PD12 каждые 3 дня по наличию молочных пятен в желудке.

Проявлением материнского каннибалистического поведения считали появление мертвых детенышей со следами укусов или травм. Пометы проверяли ежедневно на PD0—PD21. При установлении факта каннибализма погибших детенышей удаляли, а клетку и подстилочный материал заменяли новыми.

Также определяли средний размер помета, количество живых и мертвых новорожденных, рассчитывали выживаемость от 0 до 25 дней жизни (отношение количества детенышей, доживших до 25 суток, к количеству живорожденных), соотношение самцов и самок. Помет отлучали от матери в возрасте 21 суток (PD21).

Оценка развития потомства. Физиологическое развитие потомства оценивали путем определения массы тела детенышей на 3, 7, 14, 21, 28 и 35-й дни жизни с помощью электронных весов DX-2000 (A&D Company Ltd., Япония) и ежедневного наблюдения с PD0 по PD40 с фиксацией следующих параметров: период отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников и открытие влагалища [15].

Для выявления сенсорных рефлексов у детенышей [18—21] были проведены следующие тесты: плайсинговая реакция передних и задних конечностей, плайсинг вибриссный и визуальный

Таблица 1. Тестирование созревания сенсорных и моторных рефлексов

Тестирование/сутки	Описание	Оценивание реакции животных
Сенсорные рефлексы		
Плайсинг передних и задних конечностей/PD10, PD15	К передним и задним конечностям подносится тупой предмет [10]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Вибриссный плайсинг	Касание тонкого стержня вибрисс [13]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Визуальный плайсинг	Расположение животного к краю поверхности [14]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Флексинг передних и задних конечностей	Касание тонкого стержня тыльной стороны кисти и стопы [10]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Моторные рефлексы		
Амбулаторная активность	Определение двигательной активности животных [10]	0 – отсутствие движения 1 – ползание с асимметричным движением конечностей, 2 – медленное ползание, но симметричное движение конечностей 3 – быстрое ползание/ходьба
Скоринг задних конечностей	Размещение животного вверх ногами в конической трубке (объем 50 мл), задние конечности и хвост остаются вне трубки [15]	0 – сцепленные задние конечности, хвост опущен 1 – задние конечности в сжатом положении, хвост поднят 2 – задние конечности не соприкасаются, хвост наклонен в сторону 3 – задние конечности не соприкасаются, хвост поднят
Мышечная сила	Размещение животного на проволочной сетке (размерячек 1×1 мм) с последующим переворачиванием на 180° [9]	0 – удерживание менее 15 секунд 1 – удерживание 15 и более секунд
Поверхностное выпрямление	Переворачивание на конечности из положения лежа на спине [10]	“+” – менее 60 секунд “–” – более 60 секунд фиксировали общее время
Отрицательный геотаксис	Переворачивание из положения вниз головой при наклоне 45° [10]	“+” – менее 60 секунд “–” – более 60 секунд фиксировали общее время до переворачивания
Подвеска передних конечностей	Фиксация животного на натянутой проволоке передними конечностями [15]	Фиксировали общее время до падения животного

(табл. 1). Также потомство тестировали для определения нейроповеденческого моторного развития (табл. 1). Все манипуляции проводились в течение четырехчасового периода до полудня, чтобы исключить различия в поведении в зависимости от времени суток. Последовательность неонатальных моторных тестов была адаптирована с использованием батареи тестов Фокса и включала: рефлекс выпрямления, отрицательный геотаксис и тест на мышечную силу. Также проверялись амбулация, сила передних конечностей и задних конечностей.

Генотипирование. Генотипирование детенышей проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) ДНК из фрагмента кончика хвоста (3 ± 1 мм) [18]. Биоматериал, полученный от каждой особи, помещали в отдельную пробирку (1.5 мл) с присвоенным индивидуальным номером, после чего помещали в морозильную камеру при температуре $-40 \pm 1^\circ\text{C}$. Для разрушения костной ткани и облегчения процедуры выделения ДНК образец хвоста обрабатывали жидким азотом. Выделение ДНК проводи-

ли с помощью набора Сорб-ГМО-В (Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для ПЦР РВ использовали праймеры: TRH2 F KO 5' CACCCACCTTTG-CAGAAATGTTTA 3', длина ампликона — 387; TRH2 F WT 5' TGGGGCATCTCAGGACGTAG-TAGTAGT 3', длина ампликона — 437; и TRH2 R 5' TGGGGCCTGCCGATAGTAACAS 3' [5]. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе АНК-32 (SYNTOЛ, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала праймеры (300 нМ), 2.5× реакционную смесь с красителем EvaGreen (Синтол, Россия) (10 мкл) и выделенную ДНК (2 мкл). Режим реакции ПЦР был следующим: денатурация (95°C/5 мин), затем 40 циклов амплификации (95°C/15 с, 64°C/30 с и 72°C/10 с). Для идентификации проводили отдельные реакции: для выявления аллеля “дикого типа” — с парой праймеров TRH2 F WT и TRH2 R, для выявления мутантного аллеля — с TRH2 F KO и TRH2 R. Реакционные смеси без добавления ДНК использовались в качестве отрицательного контроля.

Статистика. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (Statsoft, США). Нормальность распределения данных анализировали с помощью тестов Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова, равенство вариаций определяли с помощью критерия Левена. Для проверки различий между двумя выборками парных и независимых измерений по уровню количественного признака использовали односторонний ANOVA с критериями Вилкоксона и Манна–Уитни. Анализ выживаемости потомства проводили в программе SPSS Windows, Version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) с использованием метода анализа Каплана–Майера с критерием Log-rang. Данные с нормальным распределением представлены в виде среднего со стандартным отклонением ($M \pm SD$), а также в виде диапазонов min–max (минимальное и максимальное значения измеряемой величины), медианы (ME) с межквартильным интервалом ([P25–P75]), в долях (процентах) или в абсолютных числах. Для оценки результатов, полученных в тесте “поиск”, проводился корреляционный и регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Размножение. Средняя продолжительность эстрального цикла у самок TRH2 Het составила 4.5 [3.8–4.9] дня. Анализ мазков показал более длительные стадии эструса и диэструса у 82.6% самок по сравнению с эстральным циклом самок Wt со средней продолжительностью 4.0 [3.7–4.9] дня. После помешения самок в клетки с самцами на первые 3 дня, вагинальная пробка наблюдалась у 78.5% самок TRH2 Het и у 86.9% самок Wt. Наблюдения за самками во время беременности не

выявили никаких различий в их социальном поведении или внешнем виде.

Эффективность спаривания достигала 64.3% среди TRH2 Het и 72.7% среди Wt групп. Средняя продолжительность беременности у самок TRH2 Het составила 19.0 ± 2.0 дней, у самок Wt — 19.0 ± 0.8 дней. Смертность, связанная с родами, среди самок не зарегистрирована.

Среднее количество мышат в помете TRH2 Het составило 6.0 [5.0–8.0], при соотношении самцов и самок 46/54. Средний размер помета у самок Wt составил 7.0 [7.0–8.0] мышат, при соотношении самцов и самок 42/57. Такие результаты являются нормальными для животных этой линии [8]. Генотипирование показало, что соотношение мышат по генотипу близко к нормальному менделевскому распределению (1 : 2 : 2) с гетерозиготным разведением KO/Het/Wt — 18/48/34 (1 : 2.7 : 1.9).

Материнское поведение. Оценка гнездостроения у самок TRH2 Het и WT показала идентичные результаты между двумя генотипами, средний балл составил 2.63 ± 0.52 и 2.73 ± 0.44 ($p = 0.69$) соответственно. Как показано на рис. 2а, глубина и ширина гнезд между двумя генотипами мышей практически не различались. Однако анализ материнского поведения в “поисковом тесте” выявил ряд различий (рис. 2б). В среднем, в группе TRH2 Het потребовалось на 34% ($p = 0.08$) больше времени, чтобы вернуть весь помет в гнездо: 159.0 [155.0–169.0] с для самок TRH2 Het и 97.0 [80.0–159.0] с для самок Wt. Корреляция между числом детенышей в помете и временем, затраченным на возвращение детенышей в гнездо, у самок Wt прямая и сильная ($r = 0.73$), а у самок TRH2 Het обратная и слабая ($r = -0.14$).

Для потомства самок Wt 1-й день был критическим — причиной гибели детенышей было заглатывание плаценты самками во время родов и единичные случаи (5.9%) рождения детенышей в амниотической оболочке, что привело к гибели от гипоксии, как показано на диаграмме на рис. 3. Каких-либо нарушений в способности к кормлению детенышей среди самок TRH2 Het и Wt групп не наблюдалось. Молочное пятно присутствовало у 75.0% детенышей, за исключением каннибализированных. Тем не менее, отсутствие кормления и игнорирование помета на PD0 было зарегистрировано среди 25.0% матерей TRH2 Het, что привело к гибели 100.0% детенышей в помете, в то время как каннибализм не был зарегистрирован в клетках самок Wt.

Мониторинг в послеродовой период самок TRH2 Het (от PD0 до PD25) выявил каннибализм в 66.7% случаев смерти — причиной смерти детенышей был направленный инфантицид, в то время как в 50.0% случаев самки убивали весь помет. Отмечено, что критическими были первые 3 суток после рождения и 8-й день жизни детенышей

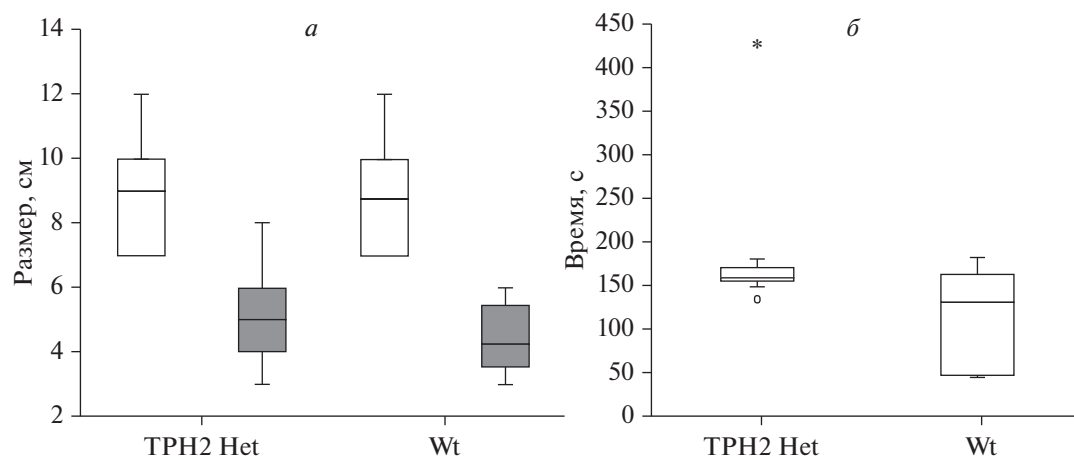


Рис. 2. Материнское поведение. Обозначения: *a* — ширина (белые квадраты) и глубина (серые квадраты) гнезд; *б* — результаты “поискового теста”. Данные представлены в виде графика качелей с границами P25–P75 и отметками минимальных и максимальных значений набора данных.

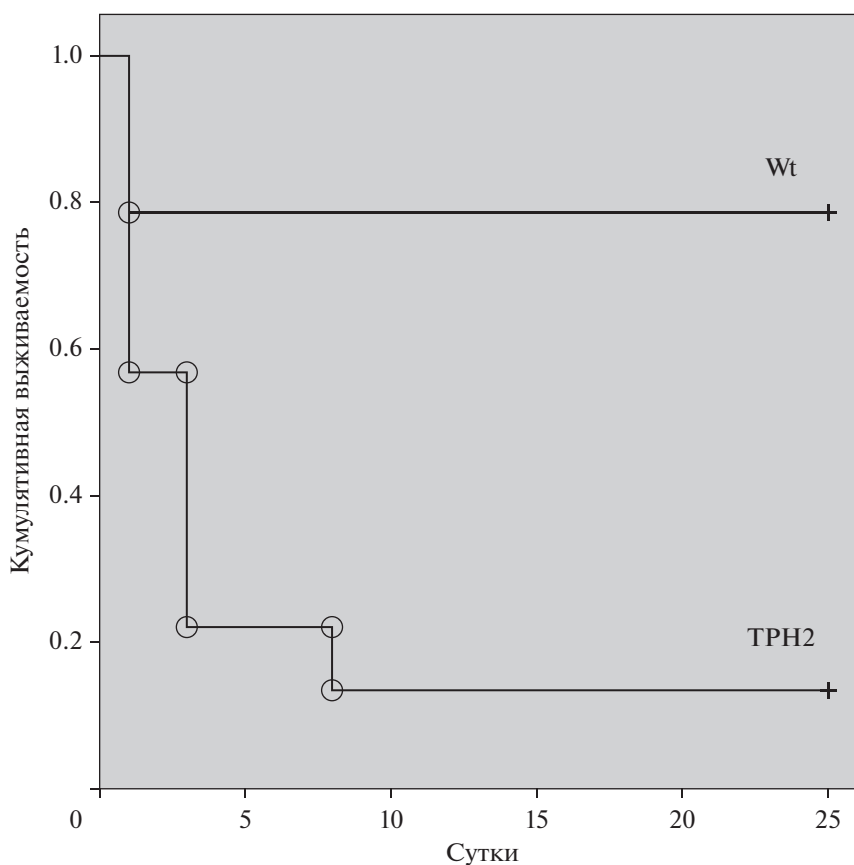


Рис. 3. Анализ выживаемости потомства по Каплану–Майеру.

(рис. 3). Исследование мертвых детенышей от TPH2 Het матерей показало, что в большинстве случаев было нанесен ущерб передней поверхности тела (передняя или брюшная части тела) — 23% случаев, а в 76% от детенышей оставалась

только область головы. Случаев 100% каннибализации тела детенышей не зарегистрировано. Среди каннибализированного потомства 64.7% принадлежали к генотипу Het, 29.4% — к КО и 5.9% — к Wt (КО/Het/Wt — 5.0/11.0/1.0). Равенство распре-

деления выживаемости для генотипов Wt и Het составило 0.0004.

Корреляционный анализ зависимости процента каннибализированных детенышей в помете TPN2 Het от оценки построения гнезда составил $r = 0.95$ ($p = 0.0001$), тогда как для группы Wt корреляция не была обнаружена.

Оценка развития потомства. Комплексная оценка морфологических и функциональных параметров постнатального онтогенеза потомства мышей выявила несколько важных различий (рис. 4). Наблюдалась значительная разница в массе тела детенышей между генотипами WT и KO. На PD7 эта разница составила 18.5% ($p = 0.01$), на PD14 – 40.1% ($p = 0.04$), PD21 – 45.2% ($p = 0.001$), PD28 – 36.9% ($p = 0.001$) и на PD35 – 27.1% ($p = 0.001$). Различий в массе тела между детенышами генотипов WT и Het обнаружено не было (рис. 4). Также наблюдалась статистическая разница в массе тела между мышатами генотипов Het и KO на PD14 – 39.6% ($p = 0.05$), PD21 – 44.3% ($p = 0.001$), PD28 – 35.4% ($p = 0.001$) и PD35 – 25.1% ($p = 0.01$). Прирост веса мышат на PD35 по сравнению с PD3 составил: для группы Wt – 16.1 [14.6–17.9] г, для группы Het – 14.9 [9.0–17.2] г и для группы KO – 11.90 [9.0–12.7] г.

Анализ физиологического развития потомства (табл. 2) показал, что у нокаутных особей появление первичного волосяного покрова, прорезывание верхних резцов и открытие влагалища наблюдалось на сутки раньше, чем у животных Wt и Het. У 84.6% детенышей Het открытие глаз было зарегистрировано на 14 день, в то время как детеныши KO и Wt открыли глаза на 15 день (16.7 и 42.8% соответственно) и на 16 день (83.3 и 57.1% соответственно).

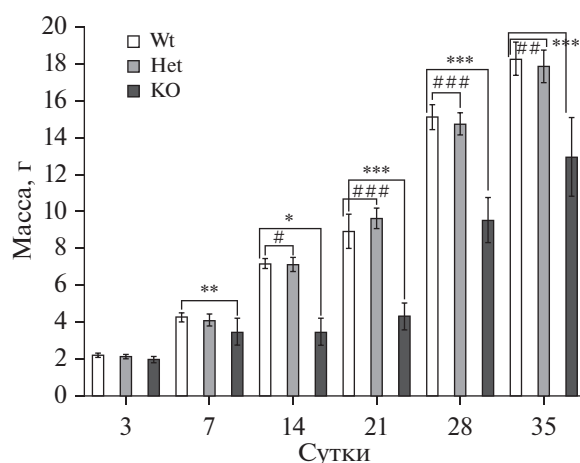


Рис. 4. Масса тела потомства от самок TPN2 Het. (Примечания: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ и *** $p \leq 0.001$ для KO по отношению к Wt; # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ и ### $p \leq 0.001$ для Het по отношению к Wt). Белый столбец представляет Wt; серый – Het; темно-серый – KO.

Анализ реакции постановки передней конечности не выявил существенных различий между исследуемыми мышатами (рис. 5a): у трех генотипов созревание рефлекса было зарегистрировано на PD5. Однако потомство Wt и KO показали худшие результаты в реакции постановки задней конечности по сравнению с мышатами Het на PD5 и PD10 (рис. 5б). У нокаутных животных был самый низкий результат на PD5 (0.20 ± 0.11 балла при отсутствии реакции у 50.0% особей), что было ниже, чем в группах Wt и Het на 66.7% ($p = 0.273$) и 67.7% ($p = 0.285$) соответственно. На PD10 потомство Het набирало 0.94 ± 0.18 балла (среди них 61.5% не проявляли реакцию). Эти значения были ниже, чем в группах Wt и KO на 17.5% ($p = 0.179$) и

Таблица 2. Физическое развитие потомства

Регистрируемый показатель	Wt		TPN2 Het		TPN2 KO	
	PD	% pups	PD	% pups	PD	% pups
Отлипание ушной раковины	3	100.0	3	100.0	3	100.0
Первичный волосяной покров	5	28.6	5	76.9	5	100.0
	6	100.0	6	100.0		
Прорезывание нижних резцов	7	100.0	7	100.0	7	100.0
Прорезывание верхних резцов	11	28.6	11	81.8	11	100.0
	12	100.0	12	100.0		
Открытие глаз	15	42.8	14	84.6	15	16.7
	16	100.0	15	100.0	16	100.0
Опускание семенников	28	50.0	28	50.0	28	50.0
	29	100.0	29	100.0	29	100.0
Открытие влагалища	37	100.0	35	66.7	35	100.0
			36	33.3		

Сокращения: PD – постнатальный день.

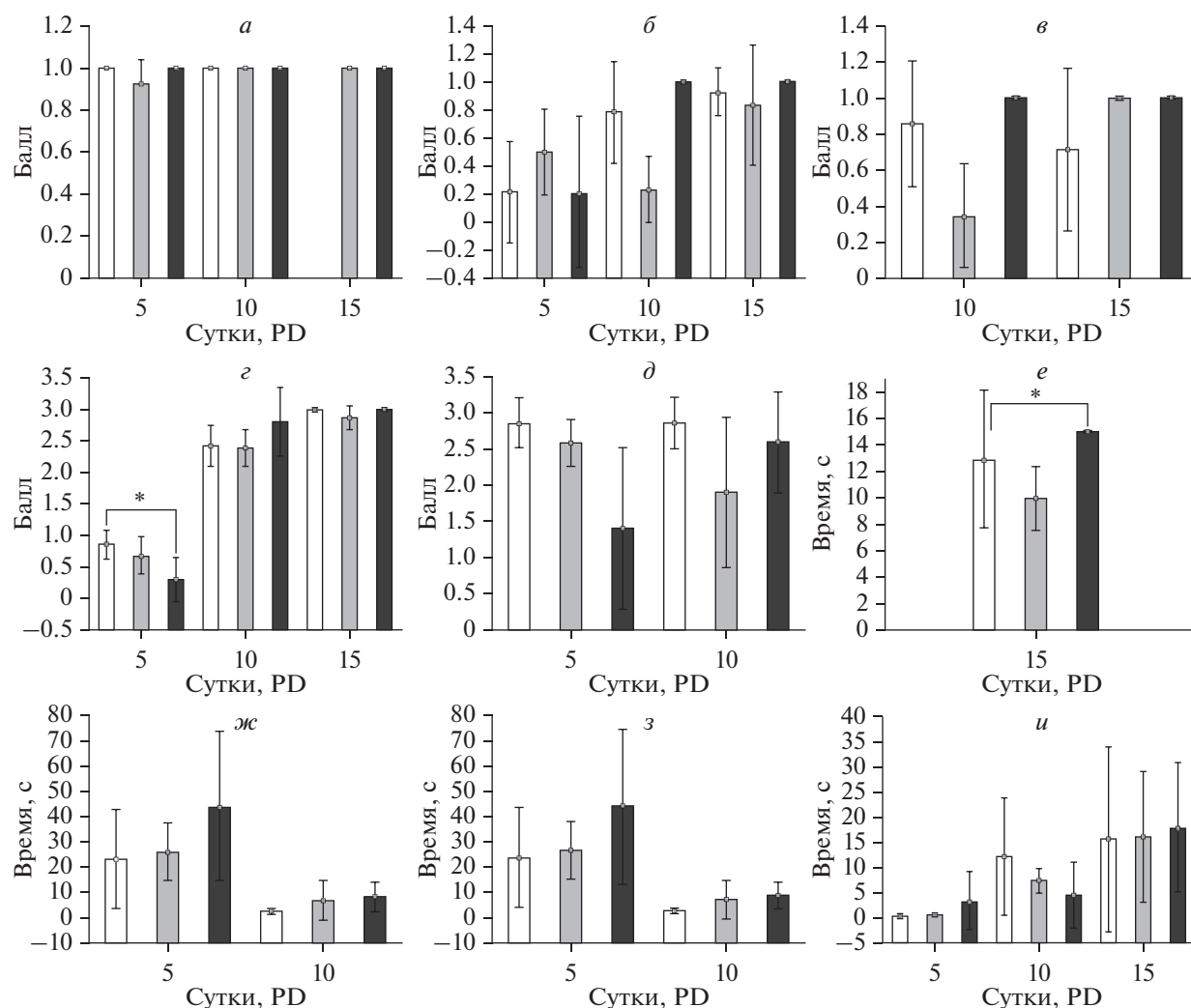


Рис. 5. Анализ постнатальных рефлексов детенышей. (Примечания: *a* – реакция плейсинга передних конечностей; *б* – реакция плейсинга задних конечностей; *в* – плейсинг вибриссный; *г* – амбуляция; *д* – скоринг; *е* – мышечная сила; *жс* – поверхностное выпрямление; *з* – отрицательный геотаксис; *и* – подвешивание передних конечностей). Данные представлены в виде графика колебаний с границами P25–P75 и отметками минимальных и максимальных значений набора данных. Белая рамка представляет Wt; серая рамка представляет Het; темно-серая рамка представляет КО. * $p \leq 0.05$ для детенышей Wt по отношению к детенышам КО.

10.6% ($p = 0.108$) соответственно. На PD15 реакция наблюдалась у всех генотипов.

При оценке реакции размещения вибрисс было отмечено, что 100% мышат Wt не имели реакции до PD10, в то время как 84.6% мышат Het и 30.0% мышат КО имели сниженную реакцию (различия недостоверны). Размещение вибрисс было полностью сформировано на PD15 у детенышей всех генотипов (рис. 5в).

При оценке двигательных рефлексов на PD5 у мышат Wt был выявлен высокий амбуляционный ответ (рис. 5г), превышающий показатели КО группы на 33.3% ($p = 0.067$) и Het группы на 22.2% ($p = 0.057$). Однако на PD10 мышата КО имели самый высокий показатель (2.8 ± 0.45), который превышал значения Wt и Het групп на 14.3% ($p = 0.345$

и $p = 0.361$ соответственно). У детенышей всех генотипов реакция была полностью сформирована на PD15 и характеризовалась плавным движением без асимметрии.

При оценке силы в тесте оценки задней конечности (рис. 5д) на PD5, у нокаутных мышат минимальный балл был на 51.7% ($p = 0.079$) ниже, чем в группе Wt. Значения в группе Het были на 10.3% ниже, чем в группе Wt ($p = 0.361$). На PD10 максимальный балл также наблюдался в группе Wt, причем он был на 24.1% выше, чем в группе Het ($p = 0.079$) и на 10.3% выше, чем в группе КО ($p = 0.592$). На PD5 по сравнению с PD10 средний балл у мышат Het снижался на 15.4% ($p = 0.361$), что может указывать на некоторый дефицит мышечной силы задних конечностей.

Время удержания на перевернутом экране у мышат Het составило 9.92 ± 4.01 с, что на 34.0% ниже, чем у Wt и КО ($p = 0.043$ и $p = 0.067$), и также подтверждает недостаток мышечной силы у мышат генотипа Het (рис. 5e).

В тесте на поверхностное выпрямление также были выявлены различия (рис. 5ж). Возвращение в исходное положение тела на PD5 у детенышей КО превышало этот показатель у детенышей Wt на 52.7% ($p = 0.108$) и у детенышей Het на 45.3% ($p = 0.067$). На PD10 максимальное время было выявлено у мышат КО, которое превышало таковое в группе Het на 35.1% ($p = 0.500$) и в группе Wt на 72.2% ($p = 0.067$). В то же время в группе Het эти показатели превышали значения группы Wt на 70.8% ($p = 0.067$).

При анализе результатов теста отрицательного геотаксиса (рис. 5з) были обнаружены некоторые изменения вестибулярной функции у нокаутных мышат на PD5 и PD10: время, затраченное на возвращение в положение “голова вверх”, было больше, чем в группе Het на 36.8% ($p = 0.144$) и 24.7% ($p = 0.685$), а в группе Wt на 48.6% ($p = 0.059$) и 70.7% ($p = 0.465$) соответственно. При этом время поворота у детенышей Het на PD5 превышало показатели Wt группы на 22.9% ($p = 0.172$).

Сила передних конечностей, оцененная в тесте подвешивания на PD10, оказалась ниже как в группе Het, так и в группе КО на 38.8% ($p = 0.204$) и на 78.5% ($p = 0.361$) и составила 7.38 ± 3.88 с и 2.60 ± 0.89 с соответственно по сравнению с Wt мышатами (рис. 5и). Разница в силе передних конечностей между генотипами Het и КО составила 64.8% ($p = 0.177$). На PD15 максимальное время висения было отмечено в группе Het (19.18 ± 4.82 с), что превышало значения групп КО (14.21 ± 8.22 с) и Wt (8.17 ± 4.17 с) на 25.6% ($p = 0.592$) и 18.3% ($p = 0.892$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Репродуктивные показатели при разведении гетерозиготных TRH2 мышей характеризовались как нормальные, за исключением эффективности спаривания, которая была снижена на 10.3% по сравнению со средним показателем (75.0%) у мышей дикого типа, что может быть связано с аверсивным поведением самок с дефицитом серотонина [4, 9].

Анализ материнского поведения выявил некоторые отклонения среди самок TRH2 Het, которые включали нарушения в возвращении детенышей в гнездо и повышенный процент детоубийств. Средний балл за гнездовое поведение был близок к максимальному значению, а нарушений в поведении при кормлении детенышей обнаружено не было. Наши результаты также подтверждаются другим исследованием этой генетической модели

с дефицитом серотонина [18]. Как упоминалось ранее, основной причиной гибели детенышей был направленный каннибализм со стороны матерей, что может указывать на участие серотониновой сигнализации в проявлении этого поведения.

Беременность и роды являются стрессовой ситуацией [22], провоцирующей постнатальную депрессию у подопытных мышей. Этот вывод можно сделать на основании 67% смертности детенышей из-за материнского каннибализма и плохого гнездования TRH2 Het самок. Важно отметить, что эти два фактора наблюдались только у самок TRH2 Het. Ранее было показано, что самки TRH2 КО каннибализируют в основном детенышей КО, и что выживаемость детенышей Wt была выше, когда их воспитывали самки КО [23]. В нашей работе мы наблюдали повышенный процент каннибализма в отношении детенышей гетерозиготного генотипа. Похоже, что эти результаты не могут быть объяснены только влиянием генотипа матери или детеныша, и поэтому фактор отсутствия гена TRH2 может быть причиной более сложных взаимодействий [24, 25]. Мы не нашли объяснений тому, что самки TRH2 Het каннибализируют своих детенышей, преимущественно гетерозиготного генотипа, но можем отметить, что все детеныши родились живыми, и у них не было проблем с кормлением. Необходимы дополнительные исследования, чтобы понять, действительно ли это процесс каннибализма или детоубийства.

При изучении постнатального развития на 35 день с момента рождения было обнаружено отставание развития детенышей-нокауты по весу от детенышей Het и Wt. В свете плейотропного эффекта серотонина, выявленная выраженная гипофагия у нокаутных мышей может быть объяснена двумя основными неисключительными причинами: пищевой и/или метаболической. Поскольку вес детенышей трех генотипов не отличался до PD3, можно сделать вывод, что недостаток серотонина в мозге не влияет на рост и развитие плода, а скорее сказывается на раннем неонатальном развитии [12].

Несмотря на существующие данные о задержке физиологического развития мышей TRH2 КО [12, 22], в проведенных экспериментах такие основные показатели, как отлипание ушной раковины, прорезывание верхних резцов, открытие глаз и опускание семенников у мышей гомозиготного генотипа TRH2 КО наблюдались в те же сроки, что и у Wt и Het. Кроме того, такие показатели неонатального развития, как появление первичного волосяного покрова, прорезывание верхних резцов и открытие влагалища у нокаутных мышей были зафиксированы на день раньше по сравнению с детенышами других генотипов (Wt и Het). Такое быстрое развитие может быть вызвано сочетанием явлений патологической акселерации и

ретардации, эти эффекты часто диагностируются при психических заболеваниях [27], но для подтверждения этой гипотезы необходима дополнительная серия экспериментов с использованием большей выборки животных.

Тестирование нейроповеденческих рефлексов дает прогностические характеристики аномального развития и созревания коры головного мозга, что может быть важно в условиях, когда очевидной невропатологии не наблюдается [12]. При отсутствии экспрессии гена TRH2 у гомозиготных нокаутных мышей нарушение синтеза серотонина в нейронах имеет место уже в пренатальный период [26], тогда как у гетерозиготных нокаутных мышей снижение содержания серотонина ниже только на 10–20% по сравнению с мышами дикого типа [9].

При изучении нейроповеденческого развития новорожденных мышей мы обнаружили незначительную задержку на PD5 в появлении некоторых неврологических рефлексов (амбуляция, отрицательный геотаксис, подвешивание передних конечностей, скрининг и плейсинг вибрисс) у детенышей нокаутного генотипа TRH2, что также показано в других исследованиях [12, 28]. Результаты повторных тестов на PD10 свидетельствуют об усилении рефлекса с наличием импульсивных реакций, за которым следует полное развитие исследуемых рефлексов на PD15. Полученные данные могут указывать на прямую связь между уровнем серотонина и ранним развитием рефлексов у новорожденных [29].

Мы также выявили некоторые отклонения в развитии двигательных рефлексов у детенышей с генотипом TRH2 Het. Так, в проявлении постуральных рефлексов (отрицательный геотаксис и поверхностное выпрямление) и в тестах, определяющих мышечную силу детенышей (подвешивание передних конечностей, скрининг и удержание на экране), результаты детенышей генотипа Het были значительно хуже, чем у Wt, начиная с PD10. В развитии сенсорных рефлексов (постановка задних конечностей) у мышей Het также были отмечены отклонения на PD10, тогда как к PD15 эти показатели нормализовались. Такая нейроповеденческая динамика, вероятно, отражает корреляцию между изменениями в постнатальном развитии и дефицитом серотонинергической иннервации мозга потомства, что требует дальнейших исследований.

С трансляционной точки зрения результаты, полученные в данном исследовании, могут свидетельствовать как о нарушении взаимодействия между депрессивной матерью и ее ребенком [11], так и нарушении его развития.

ВЫВОДЫ

Репродуктивные показатели при разведении гетерозиготных TRH2 мышей характеризовались как нормальные, однако у TRH2 Het самок была обнаружена пониженная выживаемость помета и дефицит материнского поведения. При отсутствии явных признаков измененного поведения при гнездовании было обнаружено снижение общей характеристика материнского поведения, включая нарушение в возвращении детенышей в гнездо и повышенный процент инфантицида.

На ранних стадиях постнатального развития (до PD5) поведенческие паттерны моторного и сенсорного развития мышей гомозиготного генотипа с целевым нокаутом гена TRH2 (TRH2 KO) характеризовались как задержанные. Однако результаты моторных и сенсорных тестов тех же животных на PD10 указывали на усиление рефлекса с присутствием импульсивных реакций, за которым следовало полное развитие рефлексов к PD15. Развитие двигательных рефлексов у детенышей гетерозиготного генотипа (TRH2 Het) на PD5 существенно не отличалось от показателей животных дикого типа. Однако, начиная с PD10, у мышей генотипа Het наблюдалось некоторое отставание в развитии: результаты ряда тестов, проведенных в эти периоды, были значительно ниже, чем у мышей TRH2 Wt и TRH2 KO. Таким образом, дефицит гена TRH2 вносит вклад в нарушение поведенческого и эмоционального благополучия матери и ребенка. Аномалии поведения, направленные на потомство, наблюдаемые у самок, влияют на последующее развитие потомства, особенно у гомозиготных мышей. Наши данные подтверждают гипотезу о влиянии аномального материнского поведения, обусловленного нарушением системы 5-НТ в мозге, на развитие потомства.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья опубликована в рамках темы НИР № FNEN-2019-0008 государственного задания ФГБНУ “ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова” РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Комитетом по этике Федерального исследовательского центра пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук (протокол № 11/2020 от 27 января 2021 г.).

Вклад авторов. Концептуализация: Е.Р. Василевская, курирование данных: Е.Р. Василевская, формальный анализ: Е.Р. Василевская и А.М. Зубалий, исследование: А.А. Кибиткина и Г.С. Толмачева, методо-

логия: А.А. Кибиткина, написание — первоначальный проект: А.А. Кибиткина и Г.С. Толмачева, написание — рецензирование и редактирование: Е.Р. Василевская, А.М. Зубалий. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corchs F., Nutt D.J., Corchs F., Hince D.A., Bernik M. et al. // J. Psychopharmacol. 2015. V. 29. P. 61–69.
2. Pawluski J.L., Li M., Lonstein J.S. // Front. Neuroendocrinol. 2019. V. 53. № 100742. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.03.001>
3. Gabriele S., Sacco R., Persico A.M. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2014. V. 24. P. 919–929.
4. Cordner Z.A., Marshall-Thomas I., Boersma G.J., Lee R.S., Potash J.B. et al. // Neurobiol. Stress. 2021. V. 15. № 100392.
5. Migliarini S., Pacini G., Pelosi B., Lunardi G., Pasqualetti M. // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. P. 1106–1118.
6. Auth C.S., Weidner M.T., Strekalova T., Schmitt-Böhrer A.G., Popp S. et al. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2018. V. 12. P. 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.07.103>
7. Pratelli M., Pasqualetti M. // Biochem. J. 2019. V. 161. P. 3–14.
8. Angoa-Perez M., Kane M.J., Briggs D.I., Herrera-Mundo N., Sykes C.E. et al. // ACS Chem. Neurosci. 2014. V. 5. № 10. P. 908–919.
9. Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H. et al. // Transl. Psychiatry. 2012. V. 2. № 122. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.44>
10. Strekalova T., Svirin E., Waider J., Gorlova A., Cespuglio R. et al. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2021. V. 108. № 110155.
11. Orso R., Creutzberg K.C., Wearick-Silva L.E., Wendt V.T. et al. // Front. Behav. Neurosci. 2019. V. 13 № 197. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00197>
12. Alenina N., Kikic D., Todiras M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 25. P. 10332–10337.
13. Heyne G., Plisch E.H., Melberg C.G., Sandgren E.P., Peter J.A. et al. // J. Am. Assoc. Lab. Anim. 2015. V. 54. № 4. P. 368–371.
14. Mironov A.N. // Guidelines for preclinical studies of drugs. M.: Grif and K. M.: Grif and K. 2013. 944 c.
15. Windsor Z. // Heliyon. 2019. V. 5. № 7. P. 14–28.
16. Stepanichev M.Y., Nedogreeva O.A., Klimanova M.A. et al. // Neurosci. Behav. Physi. 2022. V. 71. № 3. P. 370–386.
17. Umemura S., Imai S., Mimura A., Fujiwara M., Ebihara S. // PLoS One. 2015. V. 10. № 8. P. e0136016.
18. Martin-Sanchez A., Valera-Marin G., Hernandez-Martinez A., Lanuza E., et al. // Front. Neurosci. 2015. V. 9. P. 197–223.
19. Heyser C.J. // Curr. Protoc. Neurosci. 2004. V. 25. № 8. P. 18.
20. Pinto L.H., Enroth-Cugell C. // Mamm. Genome. 2000, V. 11. № 7. P. 531–536.
21. Feather-Schussler D.N., Ferguson T.S. // J. Vis. Exp. 2016. V. 117. P. 1–9.
22. Yun H., Park E.S., Choi S., Shin B., Yu J. et al. // PLoS Gen. 2019. V. 15 № 6. P. e1008214.
23. Muzerelle A., Soiza-Reilly M., Hainer C., Ruet P.L. et al. // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 1. P. 6004.
24. Brajon S., Morello G.M., Capas-Peneda S., Hultgren J. et al. // Animals 2021. V. 11. № 8. P. 2327.
25. Weber E.M., Algers B., Hultgren J., Olsson I.A. // Acta Vet. Scand. 2013. V. 55. № 1. P. 83.
26. Pelosi B., Migliarini M., Pacini S., Pasqualetti M. // PLoS One. 2015. V. 10. № 8. P. e0136422.
27. Wolkowitz O.M., Reus V.I., Mellon S.H. // Dialogues in Clinical Neuroscience. 2011. V. 13. № 1. P. 25–39.
28. Horvath G., Reglodi D., Farkas J., Vadasz G. et al. // Adv. Neurobiol. 2015. V. 10. P. 149–167.
29. Mosienko V., Alenina N. // Behav. Brain Res. 2018. V. 277. P. 405–420.

Alloparental Care and Postnatal Development of Heterozygous TPH2 Transgenic Mice

A. A. Kibitkina^a, E. R. Vasilevskaya^a, G. S. Tolmacheva^a, and A. M. Zubalii^b

^aGorbatov Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

^bScientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Krasnogorsk, Russia

The issue of the relationship between the transmission of a negative effect from a depressed mother to her offspring is one of the priorities in modern psychiatry. Mice with the knocked-out tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) gene have a depressive-compulsive phenotype, which makes these animals a highly appropriate bio-model for studying the role of serotonin in the body. In the offspring of such animals the following reproductive parameters were studied: pups maturation (physiological development) and sensory and motor reflexes. It was found that in the heterozygous mice, maternal care was reduced by the TPH2 gene knockout and cannibalism directed at offspring was increased. Deviations and violations in the return of pups to the nest were revealed in maternal behavior. Some deficiency in the development of heterozygous offspring was observed after 10 days. The homozygous (KO) pups had a lower body mass than the heterozygous (Het) and wild-type (Wt) pups. The rate of detachment of the auricle, eruption of the upper incisors, opening of the eyes, and lowering of the testes in the KO pups were observed at the same time as in the Wt and Het pups.

Keywords: brain serotonin, tryptophan hydroxylase-2 (TPH2), mice pups, motor function, sensory reflex, reproduction, breeding

УДК 577.25

РАЗРАБОТКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА

© 2023 г. О. В. Павлова¹, *, А. А. Мурашко², Н. В. Андрющенко¹, О. И. Гурина¹, К. А. Павлов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского” Минздрава России, Москва, Россия

²Московский Научно-исследовательский институт психиатрии — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения “Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского” Минздрава России, Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 29.05.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Одним из патофизиологических механизмов развития некоторых психических заболеваний, в том числе депрессивных расстройств, является снижение экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF), в основном, в лимбической области и префронтальной коре головного мозга. Иммунохимический скрининг BDNF в биологических жидкостях показал, что уровни этого белка можно рассматривать как маркер предрасположенности к депрессии и прогностический маркер эффективности проводимой терапии. Использование современных технологий получения рекомбинантных белков позволяет разработать высокостандартизованные тест-системы ИФА для определения данного антигена в биологических жидкостях. В данной работе описан метод создания тест-системы для количественного ИФА нейротрофического фактора мозга на основе рекомбинантного белка BDNF и антител, полученных в результате иммунизации рекомбинантным BDNF.

Ключевые слова: нейротрофический фактор мозга, моноклональные антитела, рекомбинантный белок, иммуноферментный анализ, депрессивные расстройства

DOI: 10.31857/S1027813323010156, **EDN:** EQWZUP

ВВЕДЕНИЕ

Депрессивные расстройства — это гетерогенная группа психических патологий с различной степенью тяжести, которое поражает 1.3–19% населения земного шара [1]. Этиологические факторы разнообразны, среди них можно выделить: генетические, эпигенетические и социальные, которые в совокупности приводят к развитию этого заболевания. В психиатрии существует острая потребность в выявлении различных биологических маркеров, которые позволили бы оценить риск развития расстройства, охарактеризовать динамику терапевтического процесса, спрогнозировать ответ на лечение. Изучение причин развития депрессивных расстройств определило несколько гипотез патогенеза этого заболевания: мономинная, глутаматная, нейроэндокринная с дисфункцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (НРА) оси, нейровоспалительная с изменениями уровней цитокинов [2–4]. Многие исследователи отмечают значимую роль наследственности в развитии депрессивных симптомов [5].

Согласно нейротрофической гипотезе, в основе патогенеза этого заболевания предположительно лежит дисрегуляция синтеза и высвобождения нейротрофинов, в том числе нейротрофического фактора мозга (BDNF), что приводит к изменениям нейро- и синаптической пластичности [6].

НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР МОЗГА

BDNF впервые был получен из мозга свиньи в 1982 году [7] и в настоящее время является одним из наиболее изученных белков семейства нейротрофинов. BDNF и его рецепторы TrkB обнаруживаются не только в клетках нервной ткани, но и в эндотелиальных клетках, кардиомиоцитах, сосудистых гладкомышечных клетках, лейкоцитах, мегакариоцитах. Но именно в центральной нервной системе он играет важную роль в обеспечении процессов нейрогенеза, нейро- и синаптической пластичности. Синтез BDNF — это сложный многоступенчатый процесс, в ходе которого образуются несколько изоформ данного белка. Зрелая форма BDNF связывается с высокоаффинным рецептором TrkB, активируя сигнальные каскады, инициирующие разнообразные кратко- и

* Адресат для корреспонденции: 119034, г. Москва, пер. Кропоткинский, д. 23, e-mail: uovnew@mail.ru.

долгосрочные клеточные ответы [8, 9]. Таким образом, ключевую ролью BDNF является поддержание когнитивных функций, связанных с механизмами формирования эмоций, с процессами обучения и консолидации памяти.

Многие доклинические и клинические исследования показали, что снижение экспрессии BDNF, нарушения его синтеза или рецепторов TrkB связаны с патофизиологическими механизмами развития депрессивных симптомов, а усиление экспрессии этого фактора и его рецепторов, а также увеличение высвобождения BDNF, зависящее от активности нейронов, могут лежать в основе действия антидепрессантных препаратов [10–16]. Количественное определение данного маркера в сыворотке крови пациентов может служить важным фактором выявления скрытых депрессий и оценки эффективности проводимой терапии [17].

С другой стороны, исследователи отмечают, что изменения уровня BDNF не специфичны для депрессивных расстройств и обнаруживаются при многих других заболеваниях [18–21].

Поэтому для выявления взаимосвязи концентрации BDNF с депрессивными расстройствами мы разработали твердофазный вариант ИФА на основе рекомбинантного BDNF с использованием полученных моно- и поликлональных антител к этому белку.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый BDNF человека, амплифицирована с помощью праймеров, несущих сайты узнавания рестриктаз NcoI и XhoI, (TATCCATGGACTCTGAC-CCTGCCCG и GCCCTCGAGTCTTCCCCTTTTA-ATGGTCAATGTACATACACA) из кДНК библиотеки мозга человека. Данная последовательность была клонирована по сайтам рестрикции NcoI и XhoI в плазмиду pET32a. Штамм-продуцент рекомбинантного mBDNF-TrxA культивировался в среде LB (Lysogeny broth) с добавлением ампициллина (30 мкг/мл) в ротационном шейкере-инкубаторе (37°C, 200 об./мин) до достижения культурой *E. coli* OD(600) = 0.6. Затем осуществлялась индукция экспрессии рекомбинантного белка добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) до финальной концентрации 1 мМ и продолжалось культивирование при тех же условиях еще 4–6 часов. После окончания инкубации бактериальную суспензию центрифугировали (3500g 30 мин при 4°C). Осадок лизировали в буфере (8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ TrisCl pH 8.0). Полученный лизат центрифугировали (3500g 30 мин при 4°C), и отбирали супернатант.

Супернатант смешивали с Ni-NTA-агарозой и инкубировали при умеренном встряхивании в течение 60 мин при 20°C. Далее суспензию переносили на колонку и промывали 10-кратным объемом буфера (8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ TrisCl pH 6.3). Рекомбинантный mBDNF-TrxA BDNF элюировали 2-кратным объемом колонки

элюирующим буфером (8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ TrisCl pH 4.5) и концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с диаметром пор 10 кДа до концентрации 1 мг/мл. Хранение аликвот препарата mBDNF-TrxA осуществляли при –40°C. Чистоту полученного белка оценивали методом диск-электрофореза с Ds-Na в ПААГ, иммунохимическую характеристику проводили методом иммуноблоттинга с применением коммерческих препаратов антител.

Для получения поликлональных антител проводили иммунизацию кроликов породы шиншилла в возрасте 1–1.5 года. Для иммунизации использовали 200 мкг препарата рекомбинантного mBDNF-TrxA в 0.5 мл PBS, эмульгированного с 0.5 мл полного (первая иммунизация) или неполного (последующие иммунизации) адьюванта Фрейнда, и вводили подкожно в область шейных лимфатических узлов. Иммунизацию осуществляли раз в неделю, эффективность иммунизации оценивали методом прямого ИФА. Кровь брали на пике выработки антител из краевой вены уха кролика. Сыворотки крови кролика, содержащие анти-BDNF антитела, хранили при –40°C, рабочие аликвоты при +4°C.

Для получения моноклональных антител проводили иммунизацию самок мышей линии Balb/C в возрасте 3–6 мес. Иммунизацию осуществляли 20 мкг препарата рекомбинантного mBDNF-TrxA в 50 мкл PBS, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда. Препарат вводили подкожно в основание хвоста, в область шейных лимфоузлов, вдоль брюшной цепочки лимфоузлов и в подушечки лап. Иммунизация состояла из трех циклов с перерывами на 4 недели и заключительное бустерное введение препарата. Через 5–7 сут после бустерной иммунизации сыворотку крови животных оценивали методом прямого ИФА для подтверждения иммунного ответа. Для процедуры слияния селезенку иммунизированного животного гомогенизировали, затем спленоциты смешивали с клетками миеломной культуры SP2/0-Ag14, дефектными по ферменту гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе. Процедуру слияния проводили по общепринятой методике Келера и Милштейна в нашей модификации. В течение 2 нед клетки растили на среде с добавлением гипоксантина, аминоптерина и тимидина, которая является селективной по отношению к гибридным клеткам. После переводили культуры на ростовую среду (RPMI, 10% FBS, GlutaMax, с добавлением антибиотика-антимикотика, Gibco). Скрининг гибридом осуществляли методом непрямого ИФА. Для этого препарат рекомбинантного mBDNF-TrxA иммобилизовали в лунках 96-луночных планшетов (Greiner Bio-one) в концентрации 10 мкг/мл, разводя стоковый (1.5 мг/мл) раствор в бикарбонатном буфере (0.1 М NaHCO₃ pH 9.2). В качестве вторичных использовали кроличьи антитела к мышиным IgG, конъюгированные с пероксидазой (Thermo FS). Реакцию проявляли раствором тетраметилбензидина. По результатам анализа были выбраны несколько гибридом, часть клеток которых вводились

в брюшную полость мышам с целью получения асцитов по стандартной методике, часть переводилась на специальную бессывороточную среду для гибридом (PFHM-II с добавлением антибиотика-антимикотика, Gibco) и культивировалась в суспензии (60 мм × 15 мм Cell culture dishes, Eppendorf, 5 мл среды).

Из супернатантов клеточных культур после 5–7 дней *in vitro* и асцитов получали чистые препараты антител с помощью аффинной хроматографии на протеин А-агарозе, рабочим буфером был PBS, элюирующим буфером — цитратный (100 мМ цитрата Na, pH 3.0). Элюат концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с диаметром пор 100 кДа. Препараты антител были исследованы с помощью непрямого ИФА, где в качестве антигена использовали рекомбинантный mBDNF-TrxA.

Для подтверждения взаимодействия моноклональных антител к рекомбинантному mBDNF-TrxA с нативным антигеном проводили иммуногистохимический анализ фиксированных (10% параформальдегид) срезов гиппокампа крысы (2 мес., Wistar). Для этого срезы инкубировали с моноклональными антителами в разведении 1 : 200 в буфере (PBS, 1% БСА pH 7.4) 12 ч при 4°C с предварительным блокированием эндогенной пероксидазной активности (3% H₂O₂, 10 мин) и неспецифического связывания (PBS, 3% БСА, pH 7.4, 1 ч), в качестве отрицательного контроля добавляли буфер без антител. Затем промывали трижды промывочным буфером (PBS, 0.05% Твин-20 pH 7.4) и инкубировали с кроличьими антителами к мышиным IgG, конъюгированными с пероксидазой в течение 1 ч, которые проявляли раствором диаминобензидина с перекисью водорода в субстратном буфере, следуя рекомендациям производителя (Vector Labs, DAB Peroxidase Substrate).

Кроме этого, проводили ИФА смеси белков, выделенных из тромбоцитов человека, так как известно, что BDNF в тромбоцитах содержится в α-гранулах и в цитоплазме, а синтезируется в мегакариоцитах. Для получения такого препарата использовали следующую методику: кровь собирали в пробирки с ЭДТА, центрифугировали при 400 g 30 мин (4°C). Собирали супернатант и разводили его в соотношении 1 : 1 с HEP буфером (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 3.8 мМ HEPES, 5 мМ ЭДТА, pH 7.4), перемешивали и центрифугировали при 100 g 15–20 мин (4°C). Собирали супернатант и центрифугировали при 800 g 15–20 мин (4°C). Затем к осадку добавляли 200 мкл лизирующего буфера (2% Тритон-100, 50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 8.5) и 1 мМ раствор ингибиторов протеаз (PMSF, VWR International LLC), инкубировали 20 мин при 4°C. Затем центрифугировали при 12700 g 5 мин. В полученном супернатанте измеряли концентрацию белка на спектрофотометре NP80 (Implen nanophotometer) и исследовали методом ИФА с использованием полученных моноклональных антител к рекомбинантному mBDNF-TrxA.

Для определения концентрации BDNF в сыворотке крови человека нами был разработан сэндвич-вариант ИФА. Препараты моноклональных антител разводили бикарбонатным буфером (0.1 М NaHCO₃, pH 9.2) до конечной концентрации 10 мкг/мл и иммобилизовали в лунках 96-луночного планшета (Greiner) в 100 мкл на лунку, инкубировали не менее 12 ч при 4°C во влажной камере. Далее лунки дважды промывали промывочным буфером (PBS, 0.05% Твин-20 pH 7.4). Здесь и далее промывку осуществляли на автоматическом вошере PW-40 (Bio-Rad). Для блокирования свободных сайтов связывания на планшете в лунки вносили по 100 мкл блокирующего буфера (PBS, 3% БСА pH 7.4) и инкубировали в течение 1 ч при 20°C на ротационном шейкере (500 об./мин). Затем лунки трижды промывали промывочным буфером.

На следующем этапе с использованием буфера для антигена (PBS, 1% БСА pH 7.4) готовили серию разведений препарата mBDNF-TrxA от 1500 до 11.7 пг/мл и вносили раствор BDNF по 100 мкл в лунку, инкубировали в течение 2 ч при 20°C на ротационном шейкере (500 об./мин). В 2 лунки вносили буфер без белка (контроль). В оставшиеся лунки вносили исследуемые образцы (сыворотка крови) по 100 мкл в разведение 1 : 2 в буфере для антигена. После окончания инкубации лунки трижды промывали промывочным буфером.

Затем во все лунки планшета вносили по 100 мкл препарата поликлональных анти-BDNF антител кролика (5 мкг/мл) и инкубировали 1 ч на ротационном шейкере (500 об./мин). После окончания инкубации лунки трижды промывали промывочным буфером, вносили козы антитела к кроличьим IgG, конъюгированные с пероксидазой (Thermo FS) и инкубировали 1 ч при 20°C на ротационном шейкере (500 об./мин). После 3-х кратной процедуры отмывки реакцию проявляли раствором тетраметилбензидина, затем добавляли по 100 мкл 1 М H₂SO₄. Результаты детектировали на фотометре i-Mark (Bio-Rad Laboratories) при λ = 450 нм.

Для определения точности и воспроизводимости калибровочной кривой иммуноферментного определения BDNF калибровали стандартный антиген, измеряя оптическую плотность при каждом варианте концентрации 5 раз. Доверительный интервал и стандартное отклонение анализировали в Excel.

Для верификации разработанной тест-системы был проведен пилотный эксперимент по определению уровней BDNF в сыворотке крови пациентов с первым психотическим эпизодом (1 группа), с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе (2 группа), а также была использована сыворотка крови условно здоровых доноров (контрольная группа, 14 чел.). Данные образцы были представлены ПКБ № 4 им. П.Б. Ганнушкина.

В 1 группе было 30 пациентов, средний возраст 26.8 лет. Эта группа была обследована с помощью психиатрических методов и шкал (PANSS, шкала



mBDNF v pet32a protein

Рис. 1. Схема полученного рекомбинантного белка mBDNF-TrxA (SnapGene).

депрессии Калгари, шкала мании Янга) и разделена на 3 подгруппы — пациенты с депрессивными проявлениями (4 чел.), пациенты с маниями (7 чел.) и остальные пациенты с психозом без аффективных нарушений (19 чел.).

Во 2 группе было 22 пациента, средний возраст 31.8 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Электрофоретический анализ элюата, полученного после металлохелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе, выявил бенд с молекулярной массой ~32 кДа (т.к. рекомбинантный BDNF является белком слияния) (рис. 1), иммунохимически визуализирующийся с помощью коммерческих анти-BDNF антител (рис. 2). Чистота полученного препарата составила более 95%. Этот препарат был использован для иммунизации животных для получения поли- и моноклональных антител.

В результате двух последовательных этапов клонирования с оценкой продукции антител к BDNF на каждом этапе получено несколько клонов, стабильно продуцирующих специфические моноклональные антитела. Для наработки антител использовали стандартные методы получения асцитов у мышей, а также метод культивирования в суспензии в бессывороточной среде для гибридом. После очистки на протеин-A-агарозе и концентрирования до 3–2.5 мг/мл моноклональные антитела тестировали с помощью иммуноферментного анализа и иммуногистохимического анализа на срезах гиппокампа крыс.

При иммуногистохимическом исследовании срезов гиппокампа крыс с помощью моноклональных антител к mBDNF-TrxA было обнаружено спе-

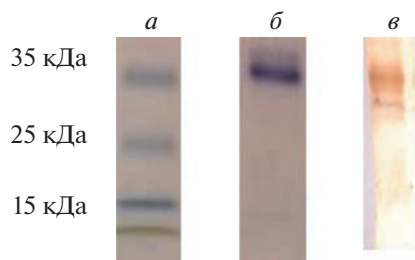
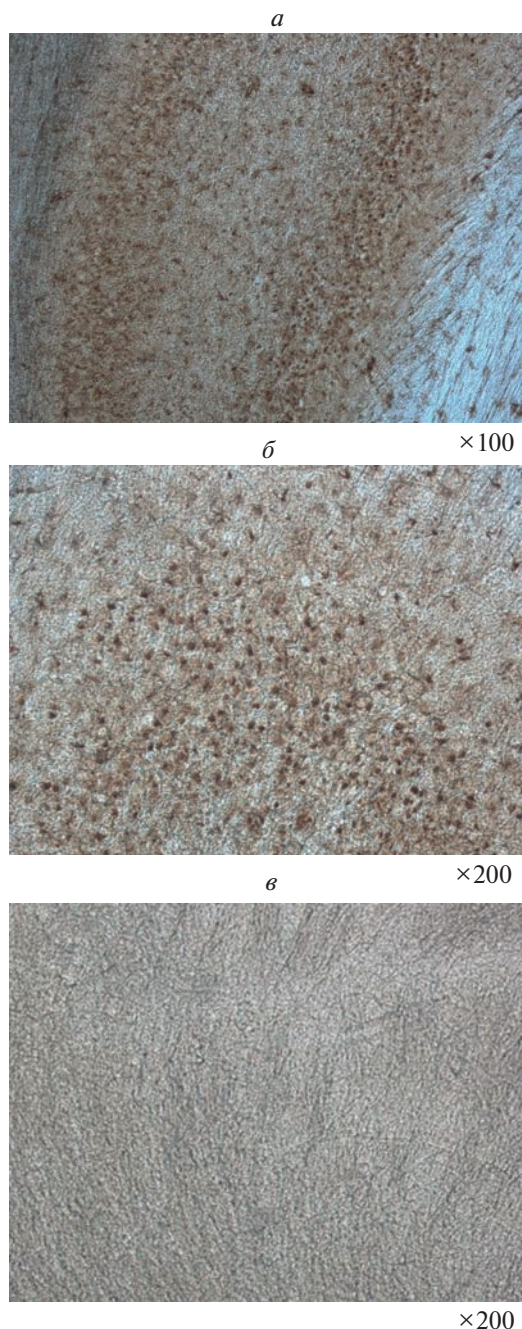
**Рис. 2.** Иммуноблоттинг рекомбинантного mBDNF-TrxA с помощью коммерческих антител. а — Маркеры молекулярной массы (Thermo FS), б — диск-электрофореграмма mBDNF-TrxA после металлохелатной хроматографии, в — иммуноблоттинг рекомбинантного BDNF с помощью антител (Abcam).**Рис. 3.** Иммуногистохимическое проявление BDNF на срезах гиппокампа крысы с помощью полученных моноклональных антител (а, б). Иммунопероксидазный метод. в — Отрицательный контроль (без первых антител). ×100 — 100-кратное увеличение, ×200 — 200-кратное увеличение.

Таблица 1. Точность и воспроизводимость калибровочной кривой иммуноферментного определения BDNF

Концентрации BDNF, пг/мл	Число определений	Среднее значение	Стандартное отклонение	Доверительный интервал	Коэффициент вариации, %
1500	5	1.139	0.014	1.125–1.153	1.2
750	5	0.819	0.0245	0.795–0.844	3
375	5	0.463	0.0093	0.454–0.472	2
187.5	5	0.252	0.0037	0.215–0.289	1.5
93.7	5	0.126	0.0039	0.122–0.130	3
46.8	5	0.096	0.0043	0.092–0.100	4.5
23.4	5	0.073	0.0037	0.069–0.077	5.1
11.7	5	0.065	0.0034	0.062–0.068	5.3

цифическое окрашивание тел пирамидальных нейронов, при этом иммунохимическая реакция в контрольных образцах отсутствовала (рис. 3).

Определение концентрации BDNF в сыворотке крови осуществляли с помощью калибровочной кривой. В качестве стандарта использовали рекомбинантный mBDNF-TrxA в концентрациях от 1500 до 11.7 пг/мл. Точность и воспроизводимость калибровки подтверждается результатами анализа доверительного интервала и коэффициента вариации (табл. 1).

Иммуноферментный анализ препарата BDNF, выделенного из тромбоцитов, подтвердил связывание моноклональных антител с нативным антигеном, при этом его концентрация составила 1215 пг/мл.

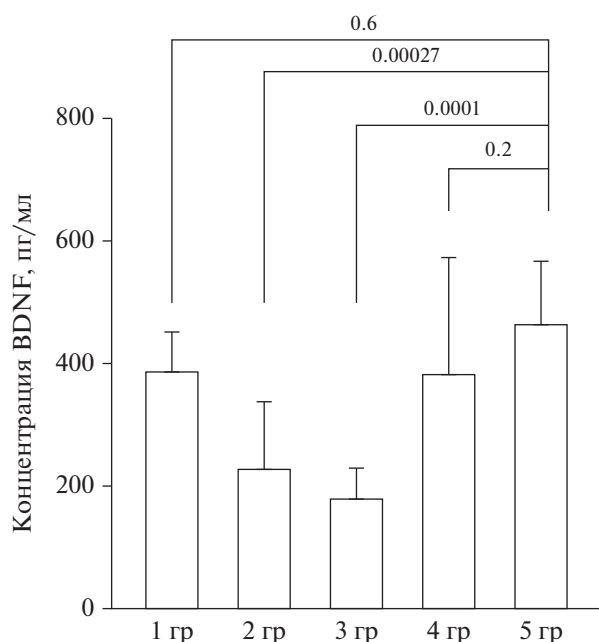


Рис. 4. Результаты иммуноферментного анализа сывороток пациентов. 1 гр. — психоз с депрессивными проявлениями, 2 гр. — психоз с маниями, 3 гр. — депрессивные расстройства с суицидальными попытками в анамнезе, 4 гр. — психоз без аффективных проявлений, 5 гр. — условно здоровые доноры.

В результате проведения ИФА BDNF в сыворотках крови пациентов выявилось, что при маниакальных состояниях (2 подгруппа) концентрация BDNF ниже, чем у остальных пациентов (1 группа) и здоровых людей, еще более низкие концентрации BDNF у пациентов с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе (2 группа) (рис. 4). Пункты шкалы PANSS, с которыми есть корреляции, в основном связаны с маниакальными и депрессивными симптомами. Связей с возрастом, длительностью продромального периода заболевания, длительностью курения, стажем работы и обучения нет.

Представленные иммуногистохимические исследования срезов гиппокампа крысы и результаты ИФА рекомбинантного белка и BDNF, выделенного из тромбоцитов, показывают, что полученные моноклональные антитела являются аффинными как к рекомбинантному, так и к нативному BDNF.

В результате проведенной работы был разработан количественный твердофазный вариант иммуноферментного определения BDNF в сыворотке крови человека. В качестве стандарта использовали рекомбинантный BDNF, в качестве первичных и вторичных антител — моно- и поликлональные антитела, полученные при иммунизации рекомбинантным белком. Рабочий диапазон для оптимального определения локализуется в интервале концентраций антигена 1500–11.7 пг/мл. Анализ результатов, представленных в табл. 1, позволяют классифицировать данную тест-систему как специфичную, точную, надежную и воспроизводимую.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета

по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Информированное согласие. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kessler R.C., Bromet E.J. // *Annu. Rev. Public. Health.* 2013. V. 34. P. 113–138.
<https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114409>
2. Stetler C., Miller G.E. // *Psychosom. Med.* 2011. V. 73. № 2. P. 114–126.
<https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e31820ad12b>
3. Irwin M.R., Miller A.H. // *Brain Behav. Immun.* 2007. V. 21. № 4. P. 374–383.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.01.010>
4. Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. // *Усп. физиол. наук.* 2014. Т. 43. № 2. С. 3–19.
5. Sullivan P.F., Agrawal A., Bulik C.M., Andreassen O.A., Borglum A.D., Breen G., Cichon S., Edenberg H.J., Faraone S.V., Gelernter J., Mathews C.A., Nievergelt C.M., Smoller J.W., O'Donovan M.C. // *Am. J. Psychiatry.* 2018. V. 175. № 1. P. 15–27.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.17030283>
6. Yang T., Nie Z., Shu H., Kuang Y., Chen X., Cheng J., Yu S., Liu H. // *Front. Cell Neurosci.* 2020. V. 14. P. 82.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00082.eCollection2020>
7. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. // *EMBO J.* 1982. V. 1. № 5. P. 549–53.
8. Kowianski P., Lietzau G., Czuba E., Waskow M., Steliga A., Morys J. // *Cell Mol. Neurobiol.* 2018. V. 38. P. 579–593.
<https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
9. Гуляева Н.В. // *Биохимия.* 2017. Т. 82. Вып. 3. С. 441–448.
10. Taliaz D., Stall N., Dar D.E., Zangen A. // *Mol. Psychiatry.* 2010. V. 15. № 1. P. 80–92.
<https://doi.org/10.1038/mp.2009.67>
11. Filho C.B., Jesse C.R., Donato F., Giacomeli R., Del Fabro L., da Silva Antunes M., de Gomes M.G., Goes A.T., Boeira S.P., Prigol M., Souza L.C. // *Neuroscience.* 2015. V. 289. P. 367–380.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.048>
12. Yoshida T., Ishikawa M., Niitsu T., Nakazato M., Watanabe H., Shiraishi T., Shiina A., Hashimoto T., Kanahara N., Hasegawa T., Enohara M., Kimura A., Iyo M., Hashimoto K. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. e42676.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042676>
13. Duman R.S., Aghajanian G.K., Sanacora G., Krystal J.H. // *Nat. Med.* 2016. V. 23. № 3. P. 238–249.
<https://doi.org/10.1038/nm.4050>
14. Duman R.S., Deyama S., Fogaça M.V. // *Eur. J. Neurosci.* 2021. V. 53. № 1. P. 126–139.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14630>
15. Mondal A.C., Fatima M. // *Int. J. Neurosci.* 2019. V. 129. № 3. P. 283–296.
<https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1527328>
16. Castren E., Kojima M. // *Neurobiol. Dis.* 2017. V. 97. P. 119–126.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.010>
17. Nobis A., Zalewski D., Waszkiewicz N. // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. 3793.
<https://doi.org/10.3390/jcm9123793>
18. Islam F., Mulsant B.H., Voineskos A.N., Rajji T.K. // *Curr. Psychiatry Rep.* 2017. V. 19. № 7. P. 36.
<https://doi.org/10.1007/s11920-017-0794-6>
19. Song J.H., Yu J.T., Tan L. // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 52. № 3. P. 1477–1493.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8958-4>
20. Nuernberg G.L., Aguiar B., Bristot G., Fleck M.P., Rocha N.S. // *Transl. Psychiatry.* 2016. V. 6. № 12. e985.
<https://doi.org/10.1038/tp.2016.227>
21. Jin W. // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. № 1. P. 257.
<https://doi.org/10.3390/jcm9010257>

Development of Quantitative Enzyme Immunoassay of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Basis of Recombinant Antigen

O. V. Pavlova^a, A. A. Murashko^b, N. V. Andriushchenko^a, O. I. Gurina^a, and K. A. Pavlov^a

^aSerbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

^bMoscow Research Institute of Psychiatry – the Branch of Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

One of the pathophysiological mechanisms of the development of some mental diseases, including depressive disorders, is a decrease in the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), mainly in the limbic region and prefrontal cortex of the brain. Immunochemical screening of BDNF in biological fluids showed that the levels of this protein can be considered as a marker of predisposition to depression and a prognostic marker of the effectiveness of therapy. The use of modern technologies for the production of recombinant proteins makes it possible to develop highly standardized ELISA systems for the determination of this antigen in biological fluids. This paper describes a method for creating a test system for quantitative ELISA of brain-derived neurotrophic factor on the basis of recombinant protein BDNF and antibodies obtained as a result of immunization with recombinant BDNF.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, monoclonal antibodies, recombinant protein, ELISA, depressive disorders

СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ХЕМОКИНОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВЫМ ЭПИЗОДОМ ШИЗОФРЕНИИ ДО НАЗНАЧЕНИЯ ТЕРАПИИ

© 2023 г. А. В. Сахаров¹, *, С. Е. Голыгина¹, А. С. Прохоров¹, П. П. Терешков¹

¹Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

Поступила в редакцию 10.06.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Роль хемокинов, участвующих в процессах нейровоспаления, недостаточно изучена при шизофрении, особенно у больных с первым эпизодом заболевания. Цель исследования — изучение содержания некоторых провоспалительных хемокинов в плазме крови у больных с первым эпизодом параноидной шизофрении. Обследовано 18 пациентов с диагнозом F20.09, контрольная группа — 35 человек. Определение содержания 13 хемокинов в сыворотке крови проводили методом проточной флюориметрии. Забор крови осуществляли до начала терапии. У пациентов с первым эпизодом шизофрении до назначения терапии установлено значимое повышение в крови относительно контрольных значений уровня CCL4 (MIP-1 β) в 1.1 раза, CXCL9 (MIG) — в 1.4 раза, CCL11 (Eotaxin), CXCL5 (ENA-78), CXCL10 (IP-10) — в 1.5 раза, CXCL1 (GRO- α) — в 1.6 раза, CCL20 (MIP-3 α) — в 2.1 раза, CXCL8 (IL-8) — в 21.0 раз. Полученные результаты свидетельствуют о важном значении нейромимунного воспаления при манифестации шизофрении с вовлечением в этот процесс хемокинов, точное значение которых требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: нейровоспаление, шизофрения, первый психотический эпизод, хемокины

DOI: 10.31857/S102781332301017X, **EDN:** ERCPHS

ВВЕДЕНИЕ

Нейровоспаление считается одним из ключевых патогенетических механизмов развития шизофрении, хотя четкие представления в данной гипотезе не являются полностью сформированными [1]. Изначально существенное внимание уделялось цитокинам, как активным участникам нейровоспаления. Было доказано, что они продуцируются не только периферическими иммунными клетками, но и нейроглией. Согласно цитокиновой гипотезе, при повреждении гематоэнцефалического барьера происходит миграция иммунных клеток в центральную нервную систему (ЦНС) с последующей хронической активацией микроглии и продукцией цитокинов. Это приводит к инициации нейровоспаления, которое запускает процессы нейродеструкции, а также изменяет нейротрансмиссию, имея самое прямое отношение к механизмам развития психических расстройств, в том числе шизофрении [2, 3].

При этом родственное цитокинам семейство хемокинов длительное время оставалось вне поля зрения исследователей. В последнее десятилетие им стали отводить значительную роль в патогенезе психических расстройств. Хемокины — это не-

большие гепаринсвязывающие пептиды, которые образуют самостоятельное суперсемейство хемотаксических цитокинов, регулирующих хемотаксис и миграцию лейкоцитов в органы и ткани, в том числе в ЦНС. Существует функциональная классификация, описывающая их двойственность, согласно которой выделяют гомеостатические и провоспалительные хемокины [4]. Первые необходимы для поддержания гомеостаза за счет участия в миграции иммунных клеток в лимфатические узлы, где они активируют антигенспецифичные Т-клетки. Вторые выделяются под влиянием провоспалительных факторов, например, липополисахаридов (ЛПС), ФНО- α , интерлейкина-1 β (IL-1 β), привлекая иммунные клетки к месту воспаления [5]. Таким образом, хемокины принимают участие не только в поддержании гомеостаза, но и во многих патологических процессах с воспалительным компонентом.

В настоящее время известно, что рецепторы и лиганды хемокинов широко экспрессируются нейрональными, глиальными и эндотелиальными клетками, как при физиологических, так и при патологических состояниях [6, 7]. Такая активная экспрессия хемокинов и их лигандов указывает на широкий диапазон выполняемых ими функций в ЦНС. Наиболее признанной функцией хемокинов является регуляция нейровоспаления [8]. Многие хемокины синтезируются в активи-

* Адресат для корреспонденции: 672000, Чита, ул. Горького, 39-а, тел.: (3022)35-43-24, e-mail: sakharov-chita@yandex.ru.

рованных астроцитах и микроглиальных клетках, участвуя в процессах миграции иммунных клеток в ЦНС за счет увеличения проницаемости гематоэнцефалического барьера [7], что указывает на их роль в процессах нейродеструкции, нейрорепарации и нейропластичности [9, 10].

Кроме того, данные недавних публикаций свидетельствуют о том, что хемокины представляют собой уникальный класс нейромедиаторов и нейромодуляторов [11]. Согласно субклеточным исследованиям, они содержатся в небольших везикулах в центральных нервных окончаниях [12], где совместно локализуются и высвобождаются с нейротрансмиттерами [13–16]. Также установлено, что хемокины участвуют в активации и ингибировании каналов ионотропных и метаботропных пресинаптических и постсинаптического рецепторов, участвуя, таким образом, в синаптической пластичности и активации эксайтотоксичности [17]. Имеются доказательства того, что некоторые хемокины (CCL2, CCL5, CXCL8) участвуют в регуляции оси гипоталамус–гипофиз–надпочечники, выполняя нейроэндокринную функцию [18].

Следовательно, хемокины играют широкий спектр разнообразных ролей в ЦНС, участвуя в регуляции процессов нейровоспаления и пластичности нейронов, пролиферации и дифференцировки их предшественников, а также выполняют нейроэндокринные и нейромодулирующие функции [19].

Учитывая многообразие выполняемых хемокинами функций, можно предположить, что их дисбаланс является важным звеном в патогенезе шизофрении. Так, имеются работы, в которых установлено повышенное содержание некоторых хемокинов в плазме крови у пациентов с шизофренией [20], в ряде исследований отмечена прямо пропорциональная взаимосвязь содержания провоспалительных хемокинов с когнитивными нарушениями у пациентов с шизофренией [21]. Кроме того, определена возможная корреляционная связь между уровнем некоторых хемокинов и терапией антипсихотиками, что, по мнению ряда авторов, может служить биомаркером положительного ответа на терапию [22].

Анализ научной литературы показал, что в проведенных ранее исследованиях хемокины изучались преимущественно у пациентов с длительным течением шизофрении, публикации по данному вопросу у больных с первым психотическим эпизодом единичны и не систематизированы.

Цель исследования: изучение содержания некоторых провоспалительных хемокинов в плазме крови у больных с первым эпизодом параноидной шизофрении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе ГКУЗ “Краевая клиническая психиатрическая больница им. В.Х. Кандинского” было обследовано 18 пациентов (11 женщин и 7 мужчин) с диагнозом “Шизофрения параноидная, период наблюдения менее года” (МКБ-10: F 20.09). Воз-

раст обследуемых пациентов был в диапазоне от 18 до 40 лет (средний возраст равен 27.2 ± 1.8 лет). Возрастные ограничения были введены, чтобы не включать в исследование поздние и юношеские варианты шизофрении, которые имеют характерные особенности клиники и течения, и исключить возрастное патопластическое влияние на лабораторные показатели. Критериями исключения из исследования послужили: возраст младше 18 лет и старше 40 лет, потребление наркотических веществ и злоупотребление алкоголем, наличие черепно-мозговых травм в анамнезе, острых и хронических заболеваний любой этиологии, беременность и период лактации.

Контрольную группу составили 35 психически и соматически здоровых добровольцев. Исследуемые группы были полностью сопоставимы между собой по полу и возрасту.

Забор крови для проведения лабораторных исследований осуществлялся при поступлении пациентов в стационар до начала терапии. Лабораторная часть работы осуществлялась в лаборатории клинической и экспериментальной биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО “Читинская государственная медицинская академия” Минздрава России.

Показатели 13 провоспалительных хемокинов в сыворотке крови оценивали методом проточной флюориметрии на проточном цитометре Cyto FLEX LX (Beckman Coulter, США) с использованием тест-системы “Human Proinflammatory Chemokine Panel 1” (13-plex) (BioLegend, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Определялись: CCL2 (MCP-1, моноцитарный хемоаттрактантный белок-1), CCL3 (MIP-1 α , макрофагальный белок воспаления 1 α), CCL4 (MIP-1 β , макрофагальный белок воспаления 1 β), CCL5 (RANTES, цитокин, секретируемый активированными нормальными Т-лимфоцитами), CCL11 (Eotaxin, эозинофильный хемотаксический белок), CCL17 (TARC, тимус-регулируемый хемокин), CCL20 (MIP-3 α , макрофагальный белок воспаления 3 α), CXCL1 (GRO- α , связанный с ростом онкоген α), CXCL5 (ENA-78, пептид, активирующий нейтрофилы эпителиального происхождения), CXCL8 (IL-8, интерлейкин-8), CXCL9 (MIG, монокин, индуцируемый гамма-интерфероном), CXCL10 (IP-10, интерферон-гамма индуцированный белок 10), CXCL11 (I-TAC, интерферон-индуцируемый альфа-хемоаттрактант Т-клеток).

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с применением пакета анализа Microsoft Excel и пакета прикладных статистических программ “Statistica-12”. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й перцентили) интервала. Для сравнения двух независимых выборочных совокупностей применялся непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при показателе $p < 0.05$.

Таблица 1. Содержание хемокинов в сыворотке крови здоровых и больных острой шизофренией, Ме (25, 75)

Показатель (пг/мл)	Контроль (n = 35)	F 20.09, до лечения (n = 18)	Критерий Манна–Уитни
CCL2 (MCP-1)	354.25 (257.80; 589.60)	451.90 (279.70; 717.10)	0.7888; $p = 0.4302$
CCL3 (MIP-1 α)	40.35 (39.37; 40.90)	41.08 (38.75; 42.50)	0.9954; $p = 0.3195$
CCL4 (MIP-1 β)	27.75 (26.50; 28.89)	30.97 (27.59; 31.37)	2.4416; $p = 0.0146$
CCL5 (RANTES)	64459.40 (62475.68; 68236.10)	64722.84 (63999.17; 66402.70)	0.5353; $p = 0.5925$
CCL11 (Eotaxin)	63.70 (38.60; 82.90)	92.50 (35.50; 149.00)	2.0847; $p = 0.0371$
CCL17 (TARC)	352.10 (233.60; 521.80)	519.45 (200.70; 639.80)	1.4743; $p = 0.1404$
CCL20 (MIP-3 α)	79.10 (23.70; 149.80)	168.15 (84.20; 210.40)	2.4134; $p = 0.0158$
CXCL1 (GRO- α)	91.70 (74.80; 136.10)	146.00 (98.70; 218.90)	2.3946; $p = 0.0166$
CXCL5 (ENA-78)	862.80 (622.0; 1280.50)	1282.85 (830.40; 2595.9)	2.0378; $p = 0.0415$
CXCL8 (IL-8)	9.75 (8.39; 15.11)	205.85 (71.70; 389.40)	5.8127; $p = 0.0000$
CXCL9 (MIG)	9.10 (6.94; 11.20)	12.55 (9.20; 18.20)	3.0989; $p = 0.0019$
CXCL10 (IP-10)	27.81 (26.48; 60.70)	40.27 (27.44; 83.90)	2.0471; $p = 0.0406$
CXCL11 (I-TAC)	8.70 (5.00; 12.50)	8.30 (6.30; 12.00)	0.1127; $p = 0.9103$

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения содержания изучаемых хемокинов в плазме крови здоровых лиц и пациентов с острой шизофренией представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы, уровень CCL2 (MCP-1) в 1.3 раза превышал значения в контрольной группе, хотя отличия и не достигли значимости, что можно объяснить малой выборкой основной группы. CCL2 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, он регулирует миграцию и инфильтрацию моноцитов и макрофагов, экспрессируется эндотелиоцитами, нейронами, микроглией [7]. Имеются данные указывающие на участие CCL2 в высвобождении дофамина в ЦНС [23], что косвенно может указывать на его возможную роль в патогенезе шизофрении; повышение уровня CCL2 у больных продемонстрировано в ряде работ [24, 25].

Содержание в сыворотке крови больных острой шизофренией хемокина CCL17 (TARC) было повышенным в 1.5 раза по сравнению с показателем контроля, прослеживалась тенденция к значимости различий, что тоже мы можем объяснить недостаточной выборкой больных. CCL17 – это хемокин, синтезируемый в тимусе и регулируемый антигенпрезентирующими клетками (дендритные клетки, макрофаги и моноциты). Точные патогенетические механизмы участия данного хемокина в нейровоспалении окончательно не установлены, но имеются единичные сведения о повышении CCL17 в плазме крови у пациентов с шизофренией [26].

Стоит отметить, что содержание хемокинов CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES) и CXCL11 (I-TAC) не отличалось между здоровыми лицами и пациентами с шизофренией. Считается, что CCL5 может модулировать глутаматергическую передачу, запуская процессы нейродеструкции [27]. Публикаций, описывающих его роль, как и значение хемокинов CCL3 (MIP-1 α) и CXCL11 (I-TAC) в патогенезе шизофрении, нами не найдено.

Показатели всех остальных исследуемых хемокинов продемонстрировали значимые отличия между группами (табл. 1).

Так, содержание CCL4 (MIP-1 β) у пациентов до лечения было в 1.1 раза выше, чем у представителей группы контроля ($p < 0.02$). CCL4 или макрофагальный воспалительный белок-1 β является хемоаттрактантом для естественных клеток-киллеров, моноцитов и множества других иммунных клеток. Его роль связывают с поддержанием хронического воспаления [28]. Встречаются единичные публикации о роли этого хемокина в нейровоспалении [29].

Еще один показатель, который также был повышен у больных в 1.5 раза ($p < 0.04$) относительно контрольных значений, это CCL11 (Eotaxin) – эозинофильный хемотаксический белок. Он напрямую связан с нейрогенезом и нейродегенерацией, так как способен влиять на нейрональные клетки и микроглию. CCL11 стимулирует миграцию и активацию микроглии с последующей продукцией активных форм кислорода, потенцируя глутаматиндуцированную гибель нейронов. Повышение данного показателя было описано при шизофрении и имеет связь с тяжестью психопатологических и когнитивных расстройств [30].

Уровень CCL20 (MIP-3 α) – макрофагального белка воспаления 3 – превысил показатели группы контроля в 2.1 раза ($p < 0.02$). Данный белок (как и белки MIP-1 α , MIP-1 β), по наблюдению ученых, выполняет функцию межклеточного мессенджера, регулирующего миграцию и активацию лейкоцитов, в том числе моноцитов/макрофагов, в очаг воспаления, которые осуществляют воспалительные реакции под влиянием провоспалительных цитокинов. Он экспрессируется в сосудистом сплетении и субарахноидальном пространстве, легко проходя через гематоэнцефалический барьер. В некоторых исследованиях выявлены более высокие уровни данного хемокина у больных шизофренией, особенно у лиц пожилого возраста [31].

Следующие хемокины: CXCL1 (GRO- α) — связанный с ростом онкоген α , CXCL5 (ENA-78) — пептид, активирующий нейтрофилы эпителиального происхождения, являются мощными хемоаттрактантами нейтрофилов за счет взаимодействия с CXCR2-рецептором. Сверхэкспрессия CXCR2-рецептора астроцитами усиливает миграцию и накопление нейтрофилов в ЦНС, запуская тем самым процессы нейровоспаления [32, 33]. В одном из исследований CXCL1 и CXCL5 были высоко экспрессированы в тканях головного мозга у пациентов с шизофренией [34]. В нашей работе содержание в плазме крови больных острой шизофренией CXCL1 было повышенным в 1.6 раза, CXCL5 — в 1.5 раза ($p < 0.02$) относительно контрольных значений.

Но самое существенное отличие между группами получено нами для показателей CXCL8 (IL-8). Так, содержание IL-8 превышало контрольные значения в 21.0 раз ($p = 0.0000$). CXCL8 — один из основных провоспалительных хемокинов, который индуцирует хемотаксис гранулоцитов, моноцитов/макрофагов и лимфоцитов в очаг воспаления. Он способен активировать нейтрофилы, стимулируя их дегрануляцию, усиливает выработку провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками. Установлено, что CXCL8 (IL-8) в высоких концентрациях неблагоприятно влияет на функции микроциркуляторного русла, способствует окислительному повреждению эндотелия. По наблюдениям ряда авторов, отмечается повышение данного показателя в сыворотке крови у пациентов при шизофрении [35], кроме того, сообщается о значительной экспрессии CXCL8 в тканях головного мозга у пациентов с шизофренией [34].

Еще один хемокин CXCL9 (MIG) — монокин, индуцируемый гамма-интерфероном (IFN- γ) — был повышен в 1.4 раза ($p < 0.002$) по сравнению с контрольной группой. Данные литературы указывают на значительную роль CXCL9 и его рецептора CXCR3 в ЦНС, так как он экспрессируется на астроцитах и эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга человека [36]. Предполагается, что CXCL9 может быть вовлечен в нейрон-глиальное взаимодействие [37]. Очевидно, что данный хемокин преимущественно вовлечен в ответ Th-1, так как его экспрессия индуцируется IFN- γ . Соответственно, активированные Т-клетки в периваскулярной среде экспрессируют IFN- γ , индуцируя экспрессию CXCL9 в окружающих глиальных клетках, которые селективно привлекают к месту воспаления дополнительные активированные Т-лимфоциты, запуская, таким образом, нейровоспаление [38]. Литературные данные об уровне CXCL9 (MIG) в плазме крови у пациентов с шизофренией нами не найдены.

Содержание CXCL10 (IP-10) — интерферон-гамма индуцированного белка 10 — в крови пациентов с первым эпизодом параноидной шизофрении превышало значения в группе сравнения в 1.5 раза ($p < 0.05$). Этот хемокин секретируется макрофагальными клетками, инфицированными вирусами и бактериями, особенно после того, как Т-клетки

распознают специфические пептиды на поверхности антиген-презентирующих клеток. Доказано, что повышенный уровень CXCL10 усиливает проницаемость гематоэнцефалического барьера, запускает эксайтотоксичность [39], участвует в рекрутировании микроглии [40], реализуя нейровоспаление и нейродеструкцию, что косвенно свидетельствует о течении данных патологических процессов у исследуемых пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют существенный рост содержания многих провоспалительных хемокинов в плазме крови у пациентов с первым эпизодом шизофрении до назначения терапии, что подтверждает весомую роль процессов нейроиммунного воспаления при данном заболевании.

Установлено, что при манифестации шизофренического психоза присутствует повышение в крови относительно контрольных значений уровня CCL4 (MIP-1 β) в 1.1 раза, CXCL9 (MIG) — в 1.4 раза, CCL11 (Eotaxin), CXCL5 (ENA-78), CXCL10 (IP-10) — в 1.5 раза, CXCL1 (GRO- α) — в 1.6 раза, CCL20 (MIP-3 α) — в 2.1 раза, CXCL8 (IL-8) — в 21.0 раз.

Таким образом, представленные данные указывают на значимость нейроиммунопатологических механизмов при манифестации шизофрении, точное значение которых требует дальнейших исследований, в том числе в зависимости от вида назначаемого антипсихотика.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки, выполнялось за счет бюджетного финансирования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и Правилами клинической практики в Российской Федерации. Исследование одобрено в локальном этическом комитете ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России 10.11.2021 года (протокол № 117).

Информированное согласие. От всех включенных в исследование получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костюкова А.Б., Мосолов С.Н. // Современная терапия психических расстройств. 2013. № 4. С. 8–17.
2. Muller N., Ackenheil M. // Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry. 1998. V. 22. P. 1–33.
3. Monji A., Kato T., Kanba S. // Psychiatry and Clinical Neurosciences. 2009. V. 63. P. 257–265.

4. Le Thuc O., Blondeau N., Nahon J.L., Rovere C. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015. V. 1351. P. 127–140.
5. Zlotnik A., Yoshie O. // *Immunity*. 2000. V. 12. P. 121–127.
6. Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Schettini G. // *Journal of Neurochemistry*. 2002. V. 82. № 6. P. 1311–1329.
7. Dimitrijevic O.B., Stamatovic S.M., Keep R.F., Andjelkovic A.V. // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007. V. 26. № 6. P. 797–810.
8. Jaerve A. // *Cell Tissue Res*. 2012. № 349. P. 229–248.
9. Kettenmann H., Kirchhoff F., Verkhratsky A. // *Neuron*. 2013. V. 77. P. 10–18.
10. Biber K., Neumann H., Inoue K., Boddeke H. // *Trends Neurosci*. 2007. V. 30. P. 596–602.
11. Rostene W., Kitabgi P., Parsadaniantz S.M. // *Nat. Rev. Neurosci*. 2007. V. 8. P. 895–903.
12. Van Steenwinckel J., Reaux Le Goazigo A., Pommier B., Mauborgne A., Dansereau M.A., Kitabgi P., Sarret P., Pohl M., Melik-Parsadaniantz S. // *J. Neurosci*. 2011. V. 31. P. 5865–5875.
13. Banisadr G., Skrzydelski D., Kitabgi P., Rostene W., Parsadaniantz S.M. // *Eur. J. Neurosci*. 2003. V. 18. P. 1593–1606.
14. Dansereau M.A., Gosselin R.D., Pohl M. et al. // *J. Neurochem*. 2008. V. 106. P. 757–769.
15. Skrzydelski D., Guyon A., Dauge V., Rovere C., Apartis E., Kitabgi P., Nahon J.L., Rostene W., Parsadaniantz S.M. // *J. Neurochem*. 2007. V. 102. P. 1175–1183.
16. Bhattacharyya B.J., Banisadr G., Jung H., Ren D., Cronshaw D.G., Zou Y., Miller R. // *J. Neurosci*. 2008. V. 28. P. 6720–6730.
17. Sciacaluga M., Fioretti B., Catacuzzeno L. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2010. V. 299. P. 175–184.
18. Rostene W. // *Front. Neuroendocrinol*. 2011. V. 32. P. 10–24.
19. Stuart M.J., Singhal G., Baune B.T. // *Front. Cell. Neuroscience*. 2015. V. 9. № 10. P. 357–383.
20. Hong S., Lee E.E., Sirkin M.A. // *J. Schres*. 2017. № 181. P. 63–69.
21. Klaus, Federica // *Journal of Psychiatric Research*. 2021. V. 138. P. 139–145.
22. Lin Y. // *Shanghai Arch. Psychiatry*. 2017. V. 29. № 5. P. 287–294.
23. Guyon A., Skrzydelski D., De Giry I., Rovere C., Conductier G., Trocello J.M., Dauge V., Kitabgi P., Rostene W., Nahon J.L., Melik-Parsadaniantz S. // *Neuroscience* 2009. V. 162. № 4. P. 1072–1080.
24. Lin Y., Peng Y., Zhu C., Su Y., Shi Y., Lin Z., Chen J., Cui D. // *Shanghai Arch. Psychiatry*. 2017. V. 29. № 5. P. 287–294.
25. Сахаров А.В., Мындускин И.В., Терешков П.П., Озорнин А.С., Голыгина С.Е. // *Российский психиатрический журнал*. 2021. № 4. С. 61–67.
26. Malmqvist A., Schwieler L., Orhan F., Fatouros-Bergman H., Bauer M., Flyckt L., Cervenka S., Engberg G., Piehl F. // *Schizophr. Res*. 2019. V. 210. P. 221–227.
27. Pittaluga A. // *Frontiers in Immunology* 2017. V. 8. P. 1079.
28. Bystry R.S., Aluvihare V., Welch K.A., Kallikourdis M., Betz A.G. // *Nature Immunology*. 2001. V.2 (12). P. 1126–1132.
29. Harrison S., Thumm L., Nash T.E., Nutman T.B., O'Connell E.M. // *Clinical Infectious Diseases*. 2021. V. 72(9). P. 326–333.
30. Warren K.J., Wyatt T.A. // *J. Vis. Exp*. 2019. V. 151. P. 60060.
31. Васильева Е.Ф., Брысов О.С. // *Психиатрия*. 2020. Т. 18. № 3. P. 76–85.
32. Marro B.S., Grist J.J., Lane T.E. // *J. Immunol*. 2016. V. 196. P. 1855–1864.
33. Wu F., Zhao Y., Jiao T. // *J. Neuroinflammation*. 2015. V. 12. P. 98.
34. Xu L., Qi X., Zhu C., Wan L. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat*. 2018. V. 14. P. 3393–3403.
35. Ушаков В.Л., Малащенко И.К., Костюк Г.П., Захарова Н.В., Крынский С.А., Карташов С.И., Огурцов Д.П., Бравве Л.В., Кайдан М.А., Хайлов Н.А., Чекулаева Е.И., Дидковский Н.А. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020. Т. 120. № 11. С. 70–78.
36. Müller M., Carter S., Hofer M.J. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2010. V. 36. № 5. P. 368–387.
37. Xia M.Q., Bacskai B.J., Knowles R.B., Qin S.X., Hyman B.T. // *J. Neuroimmunol*. 2000. V. 108. № 1–2. P. 227–235.
38. Salmaggi A., Gelati M., Dufour A. // *J. Interferon Cytokine Res*. 2002. V. 22. № 6. P. 631–640.
39. Sui Y., Stehno-Bittel L., Li S. // *Eur. J. Neurosci*. 2006. V. 23. № 4. P. 957–964.
40. Li H., Gang Z., Yuling H. // *J. Immunol*. 2006. V. 177. № 6. P. 3644–3656.

Blood Content of Pro-Inflammatory Chemokines in Patients with First Episode of Schizophrenia before Therapy

A. V. Sakharov^a, S. E. Golygina^a, A. S. Prokhorov^a, and P. P. Tereshkov^a

^aChita State Medical Academy, Chita, Russia

The role of chemokines involved in the processes of neuroinflammation is not well understood in schizophrenia, especially in patients with the first episode of the disease. The aim of the study: to study the content of pro-inflammatory chemokines in the blood of patients with the first episode of paranoid schizophrenia. We examined 18 patients with a diagnosis of F20.09, the control group – 35 people. Determination of the content of 13 chemokines in blood serum was carried out by flow fluorometry. Blood sampling was carried out before the start of therapy. In patients with the first episode of schizophrenia before the appointment of therapy, an increase in the blood level of CCL4 (MIP-1β) by 1.1 times, CXCL9 (MIG) – by 1.4 times, CCL11 (Eotaxin), CXCL5 (ENA-78), CXCL10 (IP-10) – 1.5 times, CXCL1 (GRO-α) – 1.6 times, CCL20 (MIP-3α) – 2.1 times, CXCL8 (IL-8) – 21.0 times. The results obtained indicate the importance of neuroimmune inflammation in the manifestation of schizophrenia with the involvement of chemokines in this process.

Keywords: neuroinflammation, schizophrenia, first psychotic episode, chemokines