

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 3

Март 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 3, 2023

Биохимические аспекты разных уровней нейропластичности: молекулы, гены, синапсы, клетки, когнитивные процессы (специальный выпуск)

Часть I

Редактор выпуска — Н.В. Гуляева

Роль полиморфизма C1473G в гене триптофангидроксилазы-2 в эффектах острого введения этанола на экспрессию гена <i>c-fos</i> и метаболизм биогенных аминов в мозге мышей <i>Д.В. Базовкина, Д.В. Фурсенко, В.С. Наumenко, А.В. Куликов</i>	355
Дифференцированный подход к фармакотерапии расстройств аутистического спектра: биохимические аспекты (обзор) <i>И.С. Бокша, Т.А. Прохорова, О.К. Савушкина, Е.Б. Терешкина, Г.Ш. Бурбаева</i>	368
Протеасомный интерактом и его роль в механизмах пластичности мозга (обзор) <i>О.А. Бунеева, А.Т. Копылов, А.Е. Медведев</i>	388
Роль липидов в регуляции нейроглиальных взаимодействий (обзор) <i>О.В. Галкина, О.В. Ветровой, И.Е. Красовская, Н.Д. Ещенко</i>	409
Изменение свойств глутаматергической системы гиппокампа крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии <i>Г.П. Диеспиров, Т.Ю. Постникова, А.В. Грифлюк, А.А. Коваленко, А.В. Зайцев</i>	429
Симпатическая иннервация и эндогенные катехоламины в нервно-мышечных препаратах мышц разного функционального профиля <i>С.А. Дмитриева, С.Г. Вологин, А.Н. Ценцевицкий, А.Ю. Архипов, В.Ф. Хузахметова, Г.В. Сибгатуллина, Э.А. Бухараева</i>	443
Перспективы использования интраназально вводимых инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1 при церебральной ишемии (обзор) <i>И.И. Зорина, Н.Ф. Аврова, И.О. Захарова, А.О. Шпаков</i>	455
Свойства пресинаптической пластичности в зависимости от полимеризации актина <i>И.В. Кудряшова</i>	477
Роль BDNF в нейропластичности при формировании зависимости от алкоголя (обзор) <i>Д.И. Перегуд, В.Ю. Баронец, Н.Н. Тербилина, Н.В. Гуляева</i>	491
Генетическая архитектура болезни Паркинсона (обзор) <i>М.И. Шадрина, П.А. Сломинский</i>	508

CONTENTS

Vol. 88, Issue 3, 2023

Biochemical Aspects of Different Levels of Neuroplasticity: Molecules, Genes, Synapses, Cells, Cognitive Processes (Special Issue)

Part I

Guest editor N. V. Gulyaeva

The Role of C1473G Polymorphism in Tryptophanhydroxylase-2 Gene in the Acute Ethanol Effects on <i>c-fos</i> GENE Expression and Metabolism of Biogenic Amines in Brain of Mice <i>D. V. Bazovkina, D. V. Fursenko, V. S. Naumenko, and A. V. Kulikov</i>	355
Differentiated Approach to the Pharmacotherapy of Autism Spectrum Disorders: Biochemical Aspects (Review) <i>I. S. Boksha, T. A. Prokhorova, O. K. Savushkina, E. B. Tereshkina, and G. Sh. Burbaeva</i>	368
The Proteasome Interactome and Its Role in the Mechanisms of Brain Plasticity (Review) <i>O. A. Buneeva, A. T. Kopylov, and A. E. Medvedev</i>	388
The Role of Lipid in the Regulation of Neuroglial Interactions (Review) <i>O. V. Galkina, O. V. Vetrovoy, I. E. Krasovskaya, and N. D. Eschenko</i>	409
Alterations in the Properties of the Glutamatergic System of the Rat Hippocampus in a Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy <i>G. P. Diespirov, T. Y. Postnikova, A. V. Griflyuk, A. A. Kovalenko, and A. V. Zaitsev</i>	429
Sympathetic Innervation and Endogenous Catecholamines in Neuromuscular Preparations of Muscles of Different Functional Profiles <i>S. A. Dmitrieva, S. G. Vologin, A. N. Tsentsevitsky, A. Y. Arkhipov, V. F. Khuzakhmetova, G. V. Sibgatullina, and E. A. Bukharaeva</i>	443
Prospects for the Use of Intranasally Administered Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 in Cerebral Ischemia (Review) <i>I. I. Zorina, N. F. Avrova, I. O. Zakharova, and A. O. Shpakov</i>	455
Presynaptic Plasticity is Associated with Actin Polymerization <i>I. V. Kudryashova</i>	477
Role of BDNF in Neuroplasticity Associated with Alcohol Dependence (Review) <i>D. I. Peregud, V. Yu. Baronets, N. N. Terebilina, and N. V. Gulyaeva</i>	491
Genetic Architecture of Parkinson's Disease (Review) <i>M. I. Shadrina and P. A. Slominsky</i>	508

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА C1473G В ГЕНЕ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2 В ЭФФЕКТАХ ОСТРОГО ВВЕДЕНИЯ ЭТАНОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *c-fos* И МЕТАБОЛИЗМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В МОЗГЕ МЫШЕЙ

© 2023 Д.В. Базовкина*, Д.В. Фурсенко, В.С. Науменко, А.В. Куликов

Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: daryabazovkina@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2022

После доработки 26.12.2022

Принята к публикации 29.12.2022

Триптофангидроксилаза-2 является ключевым ферментом синтеза нейромедиатора серотонина, играющего важную роль в механизмах регуляции широкого спектра физиологических функций и форм поведения. В данной работе было изучено влияние острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos* и метаболизм серотонина и катехоламинов в структурах мозга мышей конгенных линий B6-1473C и B6-1473G, различающихся однонуклеотидной заменой C1473G в гене *Tph2* и функциональной активностью фермента. Острая алкоголизация приводила к существенному росту экспрессии гена *c-fos* во фронтальной коре и стриатуме мышей B6-1473G и гиппокампе мышей B6-1473C. Введение этанола вызвало снижение индекса метаболизма серотонина в прилежащих ядрах у мышей линии B6-1473C, а также в гиппокампе и стриатуме мышей линии B6-1473G. Также этанол привел к снижению уровня норадреналина в гипоталамусе у мышей линии B6-1473C. Таким образом, полиморфизм C1473G в гене *Tph2* оказывает существенное влияние на вызванные острым введением этанола изменения паттерна экспрессии гена *c-fos* и метаболизма биогенных аминов в мозге.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: этанол, C1473G полиморфизм, триптофангидроксилаза-2, ген раннего ответа *c-fos*, серотонин, дофамин, норадреналин, мышь.

DOI: 10.31857/S0320972523030016, EDN: QVYUTF

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными исследованиями показано, что дисфункция серотониновой (5-НТ) системы головного мозга вовлечена в патофизиологию широкого спектра нервно-психических заболеваний, в том числе алкогольных расстройств [1–2]. Согласно литературным данным, полиморфизмы в генах, кодирующих ключевые элементы серотониновой системы мозга, такие как рецепторы 5-НТ1В [3], 5-НТ6 [4] и 5-НТ2А [5], транспортер 5-НТ [6], моноаминоксидаза А [7], могут обуславливать нарушения поведения, связанные с потреблением алкоголя.

Триптофангидроксилаза-2 (ТРН2) является ключевым ферментом синтеза 5-НТ в головном

мозге, некоторые полиморфизмы в гене *TRH2* человека ассоциированы с развитием нервно-психических заболеваний, включая депрессию и биполярное аффективное расстройство [8, 9]. Однако участие этого фермента в патогенезе расстройств, связанных с употреблением алкоголя, остается малоизученным. Было показано, что у страдающих алкоголизмом больных повышены уровни мРНК *TRH2* и количества белка ТПГ2 в дорзальных и медиальных ядрах шва среднего мозга [10]. Однако ряд работ, направленных на выявление ассоциаций между различными полиморфизмами в гене *TRH2* и расстройствами поведения, связанными с алкоголизмом, не показали однозначных результатов [11–14]. Таким образом, создание полноценных животных моделей для изучения

Принятые сокращения: ТПГ2 – триптофангидроксилаза-2; DA – дофамин; DOPAC – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; 5-HIAA – 5-гидроксииндолуксусная кислота; 5-НТ – серотонин, HVA – гомованилиновая кислота, NA – норадреналин; полиморфизм C1473G – замена цитозина на гуанин в положении 1473 гена *Tph2*.

* Адресат для корреспонденции.

роли гена *TPH2* в регуляции эффектов алкоголя на поведение и нервную систему является актуальной задачей.

Полиморфизм C1473G (rs33849125) в гене *Tph2* мыши представляет собой функциональную мутацию, результатом которой является замена аминокислот в белке TPH2 (Pro⁴⁴⁷ на Arg⁴⁴⁷), что, в свою очередь, приводит к двукратному снижению активности фермента и изменениям в поведении [15, 16]. В нашей лаборатории были созданы конгенные линии мышей B6-1473C и B6-1473G, различающиеся только этой однонуклеотидной заменой в гене *Tph2* [16]. Было показано, что полиморфизм C1473G в гене *Tph2* вовлечен в эффекты неблагоприятных факторов среды (острый стресс, содержание при коротком фотопериоде) на нервную систему [17–18]. Кроме этого, нами было обнаружено, что при остром введении этанол по-разному влияет на двигательную активность и тревожное поведение мышей линий B6-1473C и B6-1473G [19], однако, как при этом такое введение алкоголя влияет на центральную нервную систему у животных этих линий, оставалось неизученным. Известно, что однократная инъекция этанола может приводить к изменению метаболизма биогенных моноаминов [20], а также к активации экспрессии генов раннего ответа (например, гена *c-fos*) в мозге [21], при этом было показано влияние генотипа на эти эффекты.

Целью работы было исследование эффектов острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos*, а также содержания серотонина, норадреналина (NA), дофамина (DA) и их метаболитов в структурах мозга мышей конгенных линий B6-1473C и B6-1473G, различающихся однонуклеотидной заменой C1473G в гене триптофангидроксилазы-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Опыты проводили на взрослых (10–12 недель) самцах мышей конгенных линий B6-1473C (C/C) и B6-1473G (G/G), полученных в результате 9 возвратных скрещиваний самцов мышей F1[CC57BR(G/G) x C57BL/6(C/C)] с самками линии C57BL/6. Конгенные линии B6-1473C и B6-1473G, полученные на основе линии C57BL/6, различались только однонуклеотидной заменой C1473G в гене *Tph2* [16]. Вес животных составлял $25 \pm 0,7$ г, мышей содержали в пластиковых клетках размером $40 \times 30 \times 15$ см в стандартных условиях (температура 20–22 °C,

относительная влажность 50–60%, с регулируемым световым режимом (14 ч света и 10 ч темноты)) со свободным доступом к стандартной пище и воде. Генотипы животных, использованных в эксперименте, были дополнительно подтверждены, согласно протоколу генотипирования, описанному ранее [16]. Исследование было выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI62119X0023).

Введение этанола и выведение животных из эксперимента. За 2 дня до эксперимента мышей рассаживали в индивидуальные клетки. Введение раствора этанола (1,6 г/кг; 20%) осуществляли внутрибрюшинно [22], мыши контрольных групп получали инъекцию физраствора; через 40 мин после введения этанола животных декапитировали. Выбор дозы алкоголя и времени его действия проводили по литературным данным, поскольку на грызунах было показано, с одной стороны, увеличение уровня мРНК гена *c-fos* в течение часа при введении этанола в дозах 0,25–4 г/кг [21, 23]. С другой стороны, алкоголь может влиять на метаболизм биогенных аминов при таких параметрах введения [24].

На лду выделяли гипоталамус, фронтальную кору, область прилежащих ядер, гиппокамп, стриатум, черную субстанцию, область среднего мозга. Выбор структур был обусловлен тем, что гипоталамус, фронтальная кора, гиппокамп, стриатум являются чувствительными к нейротоксическому действию этанола на уровне экспрессии генов раннего реагирования [25–26]. Область ядер шва среднего мозга и черная субстанция являются основным местом локализации тел серотониновых [8] и дофаминовых нейронов [27] соответственно. Область прилежащих ядер и стриатум получают главным образом дофаминергические проекции, а гипоталамус, фронтальная кора, область прилежащих ядер, гиппокамп, стриатум – серотонинергические проекции [8, 27].

При выделении структур мозга ориентировались на данные атласа мозга мыши [28]. Для лобной коры использовали следующие координаты: передне-задняя (anterior-posterior, AP) – от +1,6 до +2,8; латеральная (L) – от –2 до +2; толщина среза была около 1,5 мм. Гипоталамус рассекали по координатам AP – от +0,3 до –2,9; L – от –1 до +1; дорсо-вентрально (dorsal-ventral, DV) – от 3,2 до 5,8. Оба гиппокампа были рассечены от AP –0,8 до AP –2,9. Координаты полосатого тела: AP – от +1,3 до –1,0; L – от –2,4 до –3,8 и от +2,4 до +3,8; DV – от 2,4 до 3,8. Координаты области, содержащей

прилежащие ядра: AP — от +1,8 до +1,2; L — от -1,7 до -0,5 и от 0,5 до 1,7; DV — от 4,2 до 3,6. Для среднего мозга делали краниальный срез перед верхним бугорком (AP -3) и каудальный срез перед ромбовидной ямкой (AP -7,3), после чего бугорки удаляли. Черная субстанция рассекалась по координатам: AP — от -2,7 до -3,4; L — от -1,2 до -2,0 и от +1,2 до +2,0; DV — от 3,6 до 4,4.

Проводили две серии введения этанола: образцы тканей первой серии использовали для выделения РНК (число животных в группе составило 6–7 мышей), образцы второй серии — для хроматографического анализа (число животных в группе составило 7–8 мышей). Биоматериал замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С до процедур выделения РНК или ВЭЖХ.

Выделение общей РНК. Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent («Life technologies», США), затем обработана ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase («Promega», США), 1000 о.е./мл) в соответствии с инструкциями производителей. Оптическая плотность РНК была измерена на спектрофотометре («Nanodrop», США). РНК была разведена водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранилась при -70 °С. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [29, 30].

Реакцию обратной транскрипции проводили по протоколу, описанному ранее [25]. Общую РНК (8 мкл или 1 мкг) смешивали со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкМ стерильного 1М KCl в объеме 16 мкл, денатурировали при 94 °С в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 («БИС-Н», Россия), затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей 0,5 М Tris-HCl, pH 8,3 (0,63 мкл); смесь трифосфатов 4 мМ (3,63 мкл); 0,1 М дитиотреитол (2,25 мкл); 0,1 М MnCl₂ (0,3 мкл); 2000 ед. обратной транскриптазы MuMLV («Биосан», Россия) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом. Полученную смесь (конечным объемом 31 мкл) инкубировали при 41 °С в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре -20 °С.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Экспрессию генов определяли с помощью количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории [24, 25]. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуе-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	$T_{отж.}, ^\circ\text{C}$	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>rPol2</i>	F: tgtgacaactccatacaatgc R: ctctcttagtgaatttcgtact	60	194
<i>c-fos</i>	F: aaagagaaggaaaaactggag R: cggaacaagaagtcacaa	58	264

мых генов (табл. 1), разрабатывали на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, при помощи инструментов Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) и синтезировали в компании «Биосан». Для проведения ПЦР в реальном времени 1 мкл кДНК смешивали с универсальным набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I («Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 («Roche Applied Science», Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 95 °С — 3 мин; затем 40 циклов: 95 °С — 10 с; при соответствующей температуре отжига (табл. 1) — 30 с; 72 °С — 30 с. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 и 64 нг/мкл амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) — lg Р (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением «LightCycler 480». Для контроля специфичности амплификации использовали анализ кривой плавления ПЦР-продукта для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессия гена *c-fos* представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*rPol2*), выполняющей функцию внутреннего стандарта [17, 29, 30].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Содержание 5-НТ, его метаболита 5-Н1АА (5-гидроксииндолуксусная кислота), норадреналина, дофамина и его метаболитов DOPAC (3,4-дигидроксифенилуксусная кислота) и HVA (гомованилиновая кислота) в мозге оценивали при ВЭЖХ по протоколу, описанному ранее [31]. Образцы мозга гомогенизировали в 150 мкл 0,6 М

перхлората (HClO_4), смесь центрифугировали 15 мин при 4°C и 14 000 об./мин для осаждения белка. Затем отбирался супернатант, который разбавляли бидистиллированной водой в 2 раза. Оставшийся осадок хранили при -20°C для последующего определения белка по Брэдфорду [31]. Супернатант (20 мкл) вводили в петлю системы ВЭЖХ, которая состояла из следующих компонентов: электрохимический детектор (750 мВ, DECADE IITM) и проточный элемент из стеклоуглерода (ячейка VT-03, 3 мм GC sb) («Antec», Нидерланды), системный контроллер CBM-20A, блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20A и дегазатор DGU-20A5R («Shimadzu Corporation», США). Хроматографическое разделение веществ осуществляли в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0,6 мл/мин на колонке Luna 5 мкм C18, $L \times ID$ 75 $\times$ 4,6 мм, защищенной предколонкой C8 («Pepomenex», США). Подвижная фаза состояла из 90%-ного буфера, содержащего 50 мМ дигидроортофосфата калия («Sigma Aldrich», США), 1,4 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты («Chimmed», Россия) и 0,05 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты («Sigma Aldrich», США) pH 3,9 и 10% метанола («Chimmed»). Для построения калибровочной кривой внешних стандартов использовали серию растворов, содержащих 0,5; 1 и 2 нг каждого исследуемого вещества («Sigma Aldrich»). Высота пиков была оценена при помощи программы LabSolution LG/GC («Shimadzu», США) и калибрована на соответствующий внешний стандарт. Концентрации биогенных аминов выражали в нг/мг белка.

Статистика. Результаты представляли как $m \pm \text{SEM}$ и сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (факторы «генотип» и «этанол») с последующим межгрупповым сравнением методом LSD по Фишеру. Нормальность выборок определяли по критерию Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро–Уилка. Достоверными считались различия с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия гена *c-fos*. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ($F_{1,22} = 5,23$; $p < 0,05$) и взаимодействия факторов ($F_{1,22} = 9,85$; $p < 0,01$) для уровня мРНК гена *c-fos* во фронтальной коре, при этом эффект генотипа был обнаружен на уровне тенденции ($F_{1,22} = 3,36$, $p = 0,08$). Пост-хок-анализ показал достоверное увеличение экспрессии гена *c-fos* во фронтальной коре после введения этанола только у мышей линии B6-1473G ($p < 0,01$) (рис. 1). Были найдены существенные эффекты генотипа ($F_{1,22} = 24,15$; $p < 0,001$), этанола ($F_{1,22} = 16,22$; $p < 0,001$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,22} = 23,74$; $p < 0,001$) для уровня мРНК гена *c-fos* в гиппокампе. Анализ межгрупповых сравнений показал, что рост уровня экспрессии этого гена, обусловленный введением этанола, наблюдался в гиппокампе только мышей линии B6-1473C ($p < 0,001$) (рис. 1). В стриатуме для уровня мРНК гена *c-fos* был обнаружен

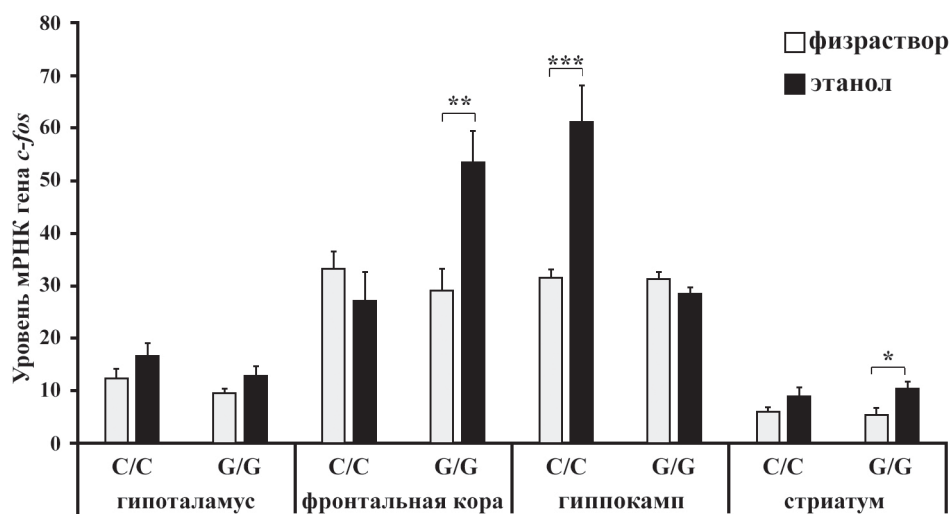


Рис. 1. Влияние острого введения этанола на экспрессию гена *c-fos* в структурах мозга мышей линий B6-1473C (C/C) и B6-1473G (G/G). Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*; $n = 6-7$ животных в группе. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

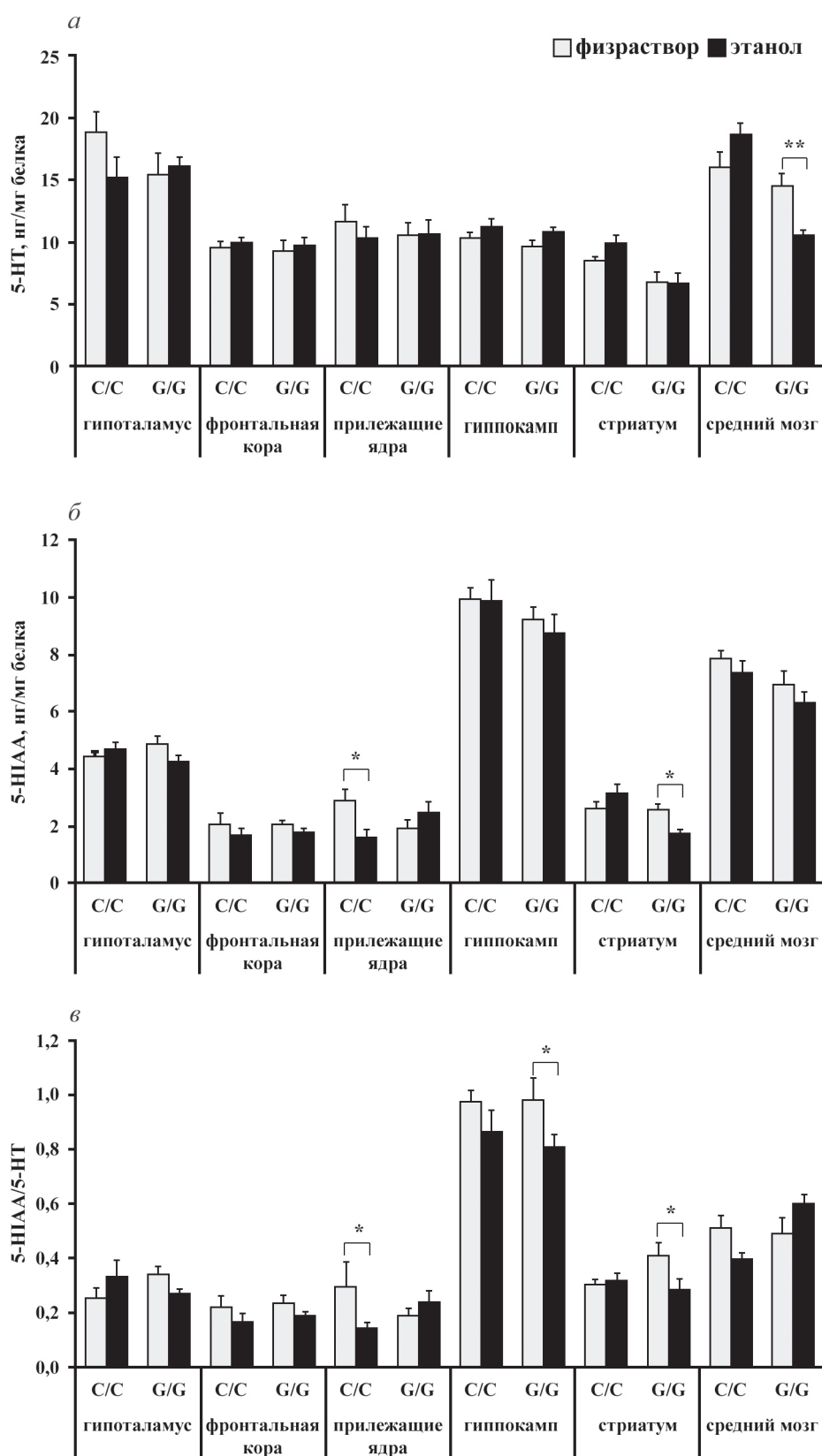


Рис. 2. Влияние острого введения этанола на содержание серотонина (а), его метаболита 5-HIAA (б) и индекс метаболизма серотонина 5-HIAA/5-HT (в) в структурах мозга мышей линий B6-1473C (C/C) и B6-1473G (G/G); $n = 7-8$ животных в группе. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

эффект этанола ($F_{1,22} = 8,52$; $p < 0,01$), но не генотипа ($F_{1,22} < 1$) и взаимодействия факторов ($F_{1,22} < 1$). Уровень мРНК гена *c-fos* был выше в стриатуме мышей В6-1473G, подвергавшихся острой алкоголизации по сравнению с мышами контрольной группы ($p < 0,05$). В гипоталамусе для уровня мРНК гена *c-fos* был найден эффект этанола ($F_{1,20} = 4,59$; $p < 0,05$), эффект генотипа на уровне тенденции ($F_{1,20} = 3,36$; $p = 0,08$) и не было обнаружено эффекта взаимодействия факторов ($F_{1,22} < 1$). Анализ межгрупповых сравнений не показал никаких различий (рис. 1).

Содержание серотонина и его метаболита 5-Н1АА. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень 5-НТ, его метаболита 5-Н1АА и индекс метаболизма серотонина 5-Н1АА/5-НТ в структурах мозга мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола, представлены в табл. 2. Анализ межгрупповых сравнений показал, что после инъекции алкоголя содержание 5-НТ в среднем мозге снизилось у мышей В6-1473G ($p < 0,01$) и выросло на уровне тенденции ($p = 0,069$) у животных

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень 5-НТ, его метаболита 5-Н1АА и индекс метаболизма серотонина 5-Н1АА/5-НТ в структурах мозга мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола

Структура	Генотип	Этанол	Генотип × Этанол
5-НТ			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,09$; $p > 0,05$	$F_{1,25} = 2,14$; $p > 0,05$
Фронтальная кора	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Гиппокамп	$F_{1,26} = 1,08$; $p > 0,05$	$F_{1,26} = 3,71$; $p = 0,065$	$F_{1,26} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 11,98$; $p < 0,01$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 1,98$; $p > 0,05$
Средний мозг	$F_{1,26} = 25,75$; $p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 12,37$; $p < 0,01$
5-Н1АА			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 3,57$; $p = 0,07$
Фронтальная кора	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,90$; $p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,13$; $p > 0,05$	$F_{1,25} = 5,06$; $p < 0,05$
Гиппокамп	$F_{1,26} = 2,71$; $p > 0,05$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 11,03$; $p < 0,01$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 12,19$; $p < 0,01$
Средний мозг	$F_{1,26} = 6,19$; $p < 0,05$	$F_{1,26} = 1,99$; $p > 0,05$	$F_{1,26} < 1$
5-Н1АА/5-НТ			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 4,62$; $p < 0,05$
Фронтальная кора	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 2,69$; $p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,04$; $p > 0,05$	$F_{1,25} = 4,66$; $p < 0,05$
Гиппокамп	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 5,02$; $p < 0,05$	$F_{1,26} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 1,07$; $p > 0,05$	$F_{1,26} = 2,04$; $p > 0,05$	$F_{1,26} = 4,11$; $p < 0,05$
Средний мозг	$F_{1,26} = 5,83$; $p < 0,05$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 8,08$; $p < 0,01$

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

линии В6-1473С (рис. 2, а). Пост-хок-анализом было обнаружено падение уровня 5-НІАА в области прилежащих ядер мышей В6-1473С ($p < 0,05$) и в стриатуме мышей В6-1473G ($p < 0,05$), получавших этанол, по сравнению с контролем (рис. 2, б). Индекс метаболизма серотонина, определяемый как 5-НІАА/5-НТ, снижался для области прилежащих ядер мышей В6-1473С ($p < 0,05$), а также гиппокампа ($p < 0,05$) и стриатума мышей В6-1473G ($p < 0,05$) после введения этанола (рис. 2, в). Примечательно, что для среднего мозга этот показатель на уровне тенденции уменьшился у животных линии В6-1473С ($p = 0,054$) и увеличился у мышей В6-1473G ($p = 0,056$) под действием алкоголя (рис. 1, в).

Содержание дофамина и его метаболитов DOPAC и HVA. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень DA, его метаболитов DOPAC, HVA и индекс метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA в структурах мозга

мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола, представлены в табл. 3. Анализ межгрупповых сравнений не выявил различий ни в одной из исследованных структур по содержанию дофамина у животных обеих линий ($p > 0,05$) (рис. 3, а). Однако в результате пост-хок-анализа было обнаружено, что уровень DOPAC в стриатуме повысился у мышей В6-1473С ($p < 0,05$) и упал – у животных В6-1473G ($p < 0,05$), получавших этанол (рис. 3, б). Кроме этого, анализ межгрупповых сравнений не выявил различий ни в одной из исследованных структур по содержанию HVA и индексу метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA у мышей обеих линий ($p > 0,05$) (рис. 3, в и г).

Содержание норадреналина. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ($F_{1,25} = 7,53$; $p < 0,05$) и взаимодействия факторов ($F_{1,25} = 6,64$; $p < 0,05$) для уровня норадреналина в гипоталамусе, при этом не было обнаружено эффекта генотипа ($F_{1,25} < 1$).

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень DA, его метаболитов DOPAC, HVA и индекс метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA в структурах мозга мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола

Структура	Генотип	Этанол	Генотип × Этанол
DA			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} = 1,91$; $p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 47,95$; $p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 2,01$; $p = 0,055$
DOPAC			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} = 3,26$; $p = 0,08$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,08$; $p > 0,05$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 6,38$; $p < 0,05$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 10,05$; $p < 0,01$
HVA			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 4,05$; $p = 0,056$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 6,80$; $p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 1,99$; $p > 0,05$
DOPAC + HVA/DA			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} = 1,62$; $p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 2,14$; $p > 0,05$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 14,36$; $p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} < 1$

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

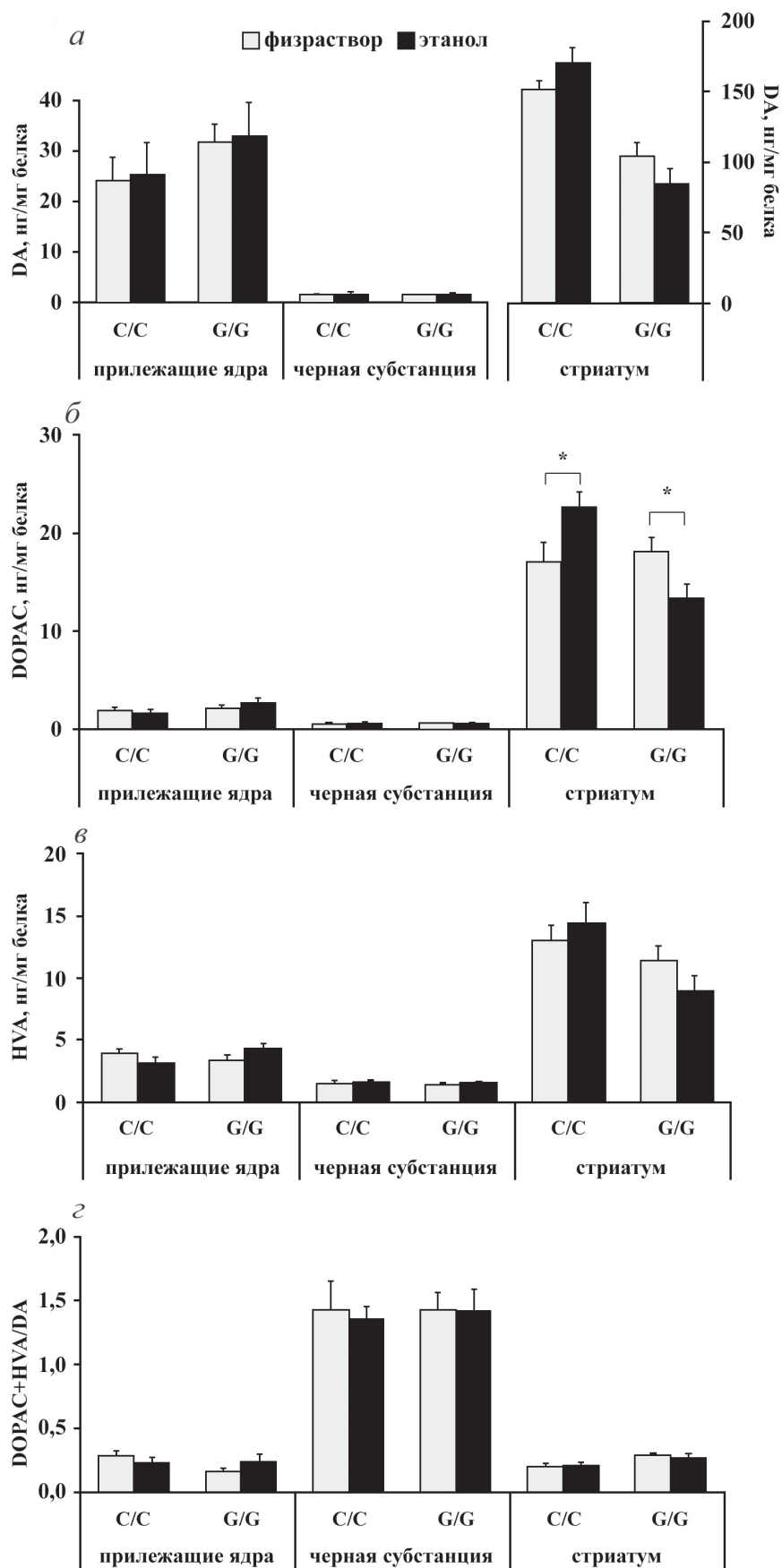


Рис. 3. Влияние острого введения этанола на содержание дофамина (а) и его метаболитов DOPAC (б), HVA (в) и индекс метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA (г) в структурах мозга мышей линий B6-1473C (C/C) и B6-1473G (G/G); $n = 7-8$ животных в группе. * $p < 0,05$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

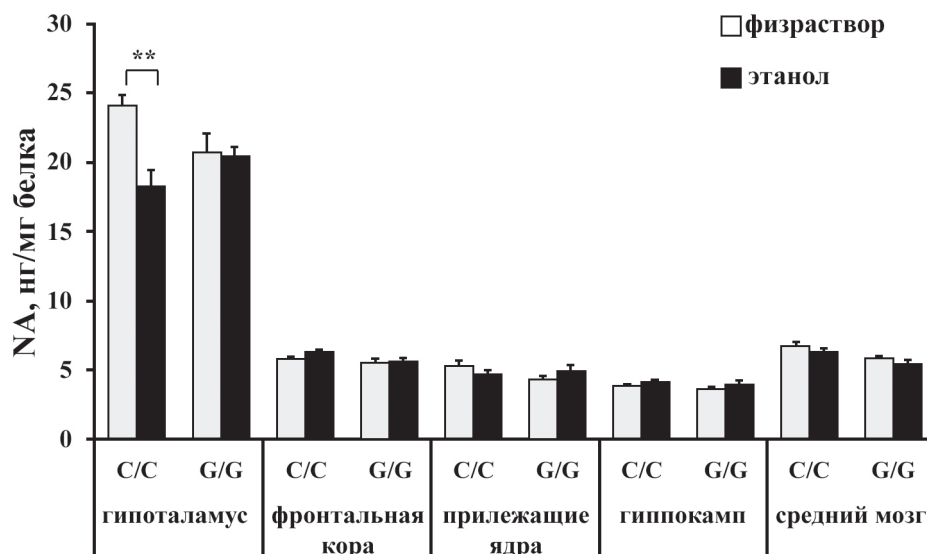


Рис. 4. Влияние острого введения этанола на содержание норадреналина в структурах мозга мышей линий B6-1473C (C/C) и B6-1473G (G/G); $n = 7-8$ животных в группе. ** $p < 0,01$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

Пост-хок-анализ показал достоверное снижение уровня этого нейромедиатора в гипоталамусе после введения этанола только у мышей линии B6-1473C ($p < 0,01$) (рис. 4). Не было обнаружено достоверного влияния ни генотипа ($F_{1,26} = 3,93$; $p = 0,058$), ни этанола ($F_{1,26} = 1,98$; $p > 0,05$), ни взаимодействия этих факторов ($F_{1,26} < 1$) для фронтальной коры. Также дисперсионный анализ не выявил эффектов генотипа ($F_{1,25} < 1$), этанола ($F_{1,25} < 1$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,25} = 2,77$; $p > 0,05$) для содержания норадреналина в области прилежащих ядер. Было найдено влияние этанола ($F_{1,26} = 6,52$; $p < 0,05$), но не генотипа ($F_{1,26} = 1,88$; $p > 0,05$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,26} < 1$) для уровня норадреналина в гиппокампе. Анализ межгрупповых сравнений выявил лишь повышение на уровне тенденции содержания этого нейромедиатора в гиппокампе мышей B6-1473G ($p = 0,66$). Для среднего мозга дисперсионным анализом был зафиксирован значительный эффект генотипа ($F_{1,25} = 15,61$; $p < 0,001$), но не этанола ($F_{1,26} = 3,95$; $p = 0,058$) и не взаимодействия этих факторов ($F_{1,26} < 1$). Анализ межгрупповых сравнений не выявил различий между контрольной и опытной группами мышей обеих линий по уровню норадреналина в среднем мозге (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью данной работы было выяснение роли полиморфизма C1473G в гене *Trh2* в эф-

фектах острого действия этанола на нервную систему мышей. Для этого мы исследовали влияние острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos* и метаболизм биогенных аминов в структурах мозга мышей конгенных линий B6-1473C и B6-1473G, различающихся однонуклеотидной заменой C1473G в гене *Trh2* и, как следствие, — функциональной активностью фермента [16].

По литературным данным, рост экспрессии гена *c-fos* является показателем нейрональной активности в мозге после воздействий, включая острую алкогольную интоксикацию [25, 32–33]. Увеличение уровня мРНК гена *c-fos* в течение часа может наблюдаться при введении этанола в дозах 0,25–4 г/кг [21, 23]. Однако некоторые исследователи отмечают, что, хотя рост экспрессии гена или белка c-Fos может дать важную информацию об активированных путях сигналинга, отрицательный результат не обязательно указывает на то, что активность нейронов не повышалась в результате экспериментальных манипуляций [34]. В нашей работе острое введение этанола по-разному изменило паттерны экспрессии гена *c-fos* в структурах мозга: увеличение мРНК *c-fos* наблюдалось в гиппокампе мышей линии B6-1473C (с нормальной активностью ТПГ2) и во фронтальной коре и стриатуме мышей линии B6-1473G (со сниженной на 50% активностью ТПГ2). Примечательно, что в проведенном ранее эксперименте по изучению эффекта острого (30 мин) эмоционального стресса экспрессия гена *c-fos* значительно увеличивалась у мышей обеих линий и в коре, и в гиппокампе [17].

Различные исследования показали, что острое введение этанола может приводить как к увеличению, так и к уменьшению уровня 5-НТ и его основного метаболита 5-НІАА во всем мозге и/или различных областях мозга, или вообще не оказывать влияния на эти параметры [35, 36]. Эти противоречия, вероятно, можно объяснить тем, что в описанных работах используются различные виды и линии животных и дизайны экспериментов (дозы этанола, способ его введения, временные интервалы и т.д.). В нашем исследовании больше изменений в метаболизме серотониновой системы мозга после введения этанола демонстрировали мыши линии В6-1473G, у которых наблюдалось достоверное снижение содержания 5-НТ в области ядер шва среднего мозга и метаболита — в стриатуме, а также уменьшение индекса метаболизма 5-НТ в гиппокампе и стриатуме. В то же время у мышей линии В6-1473С наиболее чувствительной к острому действию этанола оказалась область прилежащих ядер, где наблюдалось снижение 5-НІАА и индекса метаболизма нейромедиатора. Весьма примечательно, что изменения в показателе 5-НІАА/5-НТ для области ядер шва среднего мозга носили разнонаправленный характер (хотя и на уровне тенденции): уменьшение для мышей В6-1473С и увеличение для мышей В6-1473G. Поскольку область ядер шва среднего мозга является основным местом локализации тел серотониновых нейронов [8], можно предположить связь обнаруженного эффекта введения этанола с особенностями 5-НТ-системы мозга мышей В6-1473G. Важно отметить — несмотря на то что замена цитозина на гуанин в положении 1473 гена *Tph2* приводит к существенному снижению активности фермента ТПГ2, между контрольными группами линий В6-1473G и В6-1473С не было найдено достоверных различий в уровне серотонина, что согласуется с более ранними исследованиями [16, 37]. Этот факт может быть объяснен развитием компенсаторных процессов в серотонинергической системе мозга у мышей В6-1473G (вследствие снижения активности ТПГ2), одним из которых является десенситизация пресинаптических рецепторов 5-НТ_{1А}, локализованных в области ядер шва среднего мозга и осуществляющих регуляцию высвобождения серотонина по принципу «обратной связи» [38]. Механизмы действия острого введения этанола на высвобождение 5-НТ до сих пор остаются не до конца ясны. Считается, что в регуляции этих процессов значительную роль играет активность пресинаптических 5-НТ_{1А}-ауторецепторов [39].

Предположительно, острое введение этанола нарушает у мышей В6-1473G баланс компенсаторных процессов в области среднего мозга, и 5-НТ нейромедиаторная система мышей этой линии оказывается более чувствительной к алкоголю. Это предположение согласуется с данными литературы, демонстрирующими увеличение чувствительности ауторецепторов 5-НТ_{1А} вследствие действия этанола [40]. Нужно отметить, что 30-минутный рестрикционный стресс оказал большее влияние на метаболизм 5-НТ-системы животных линии В6-1473С [17]. Данные этого эксперимента и результаты нашей работы свидетельствуют о разных механизмах регуляции эффектов острого эмоционального стресса и острого введения этанола у мышей линий В6-1473G и В6-1473С на 5-НТ-систему мозга и экспрессию гена раннего ответа *c-fos*.

Другими важными нейромедиаторами, участвующими в контроле этанол-индуцированных эффектов на нервную систему, являются дофамин и норадреналин [41–42]. В данной работе острое введение этанола оказало разнонаправленный эффект на изменение содержания метаболита дофамина DOPAC в стриатуме: обнаружено снижение у мышей В6-1473G, а также повышение — у мышей В6-1473С. Последний результат косвенно может свидетельствовать об увеличении внеклеточного дофамина в области стриатума под действием этанола, что согласуется с данными литературы [43]. Ранее было показано, что полиморфизм С1473G в гене *Tph2* влияет на метаболизм DA-системы мозга, приводя к снижению уровней DA и DOPAC в среднем мозге и стриатуме [44], однако механизм этого влияния остается пока неясным. Вероятно, измененная регуляция дофаминовой нейромедиаторной системы у мышей линии В6-1473G обусловила различие в ответах введения этанола на эту систему мозга у животных обеих линий. Также в нашем исследовании острая алкоголизация привела к падению содержания норадреналина в гипоталамусе, но только у мышей линии В6-1473С, что согласуется с данными о большей чувствительности к острому стрессу животных этой линии [17].

Таким образом, полиморфизм С1473G в гене *Tph2* участвует в регуляции эффектов острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos* и метаболизм важнейших нейромедиаторов, таких как серотонин и катехоламины. Результаты настоящей работы говорят о том, что линии мышей В6-1473G и В6-1473С являются перспективными для изучения роли ТПГ2 в регуляции эффектов алкоголя на центральную нервную систему.

Вклад авторов. Д.В. Базовкина, А.В. Куликов — концепция и руководство работой; Д.В. Базовкина, Д.В. Фурсенко, В.С. Науменко — проведение экспериментов; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов — обсуждение результатов исследования; Д.В. Базовкина — написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00051). Содержание животных осуществлялось за счет средств бюджетного проекта FWNR-2022-0023.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры выполняли в соответствии с Международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 119н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232). Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦИГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sari, Y., Johnson, V. R., and Weedman, J. M. (2011) Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **98**, 401-443, doi: 10.1016/B978-0-12-385506-0.00010-7.
2. Marcinkiewicz, C. A. (2015) Serotonergic systems in the pathophysiology of ethanol dependence: relevance to clinical alcoholism, *ACS Chem. Neurosci.*, **6**, 1026-1039, doi: 10.1021/cn5003573.
3. Lappalainen, J., Long, J. C., Eggert, M., Ozaki, N., Robin, R. W., Brown, G. L., Naukkarinen, H., Virkkunen, M., Linnoila, M., and Goldman, D. (1998) Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT1B receptor gene in 2 populations, *Arch. Gen. Psychiatry*, **55**, 989-994, doi: 10.1001/archpsyc.55.11.989.
4. Bonasera, S. J., Chu, H. M., Brennan, T. J., and Tecott, L. H. (2006) A null mutation of the serotonin 6 receptor alters acute responses to ethanol, *Neuropsychopharmacology*, **31**, 1801-1813, doi: 10.1038/sj.npp.1301030.
5. Wrzosek, M., Jakubczyk, A., Wrzosek, M., Matsumoto, H., Łukaszkiwicz, J., Brower, K. J., and Wojnar, M. (2012) Serotonin 2A receptor gene (HTR2A) polymorphism in alcohol-dependent patients, *Pharmacol. Rep.*, **64**, 449-453, doi: 10.1016/s1734-1140(12)70787-9.
6. Boyce-Rustay, J. M., Wiedholz, L. M., Millstein, R. A., Carroll, J., Murphy, D. L., Daws, L. C., and Holmes, A. (2006) Ethanol-related behaviors in serotonin transporter knockout mice, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **30**, 1957-1965, doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00241.x.
7. Popova, N. K., Vishnivetskaya, G. B., Ivanova, E. A., Skrinskaya, J. A., and Seif, I. (2000) Altered behavior and alcohol tolerance in transgenic mice lacking MAO A: a comparison with effects of MAO A inhibitor clorgyline, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **67**, 719-727, doi: 10.1016/s0091-3057(00)00417-2.
8. Kulikova, E. A., and Kulikov, A. V. (2019) Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **23**, 655-667, doi: 10.1080/14728222.2019.1634691.
9. Zhang, X., Gainetdinov, R. R., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Burch, L. H., Williams, R. B., Schwartz, D. A., Krishnan, K. R., and Caron, M. G. (2005) Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression, *Neuron*, **45**, 11-16, doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.014.
10. Bach, H., Arango, V., Kassir, S. A., Tsaava, T., Dwork, A. J., Mann, J. J., and Underwood, M. D. (2014) Alcoholics have more tryptophan hydroxylase 2 mRNA and protein in the dorsal and median raphe nuclei, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **38**, 1894-1901, doi: 10.1111/acer.12414.
11. Zupanc, T., Pregelj, P., Tomori, M., Komel, R., and Paska, A. V. (2011) TPH2 polymorphisms and alcohol-related suicide, *Neurosci. Lett.*, **490**, 78-81, doi: 10.1016/j.neulet.2010.12.030.
12. Bragatti, J. A., Bandeira, I. C., de Carvalho, A. M., Abujamra, A. L., Leistner-Segal, S., and Bianchin, M. M. (2014) Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene polymorphisms and psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **32**, 59-63, doi: 10.1016/j.yebeh.2014.01.007.
13. Zill, P., Preuss, U. W., Koller, G., Bondy, B., and Soyka, M. (2007) SNP- and haplotype analysis of the tryptophan hydroxylase 2 gene in alcohol-dependent patients and alcohol-related suicide, *Neuropsychopharmacology*, **32**, 1687-1694, doi: 10.1038/sj.npp.1301318.
14. Gacek, P., Conner, T. S., Tennen, H., Kranzler, H. R., and Covault, J. (2008) Tryptophan hydroxylase 2 gene and alcohol use among college students, *Addict. Biol.*, **13**, 440-448, doi: 10.1111/j.1369-1600.2008.00118.x.
15. Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2004) Tryptophan

- hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis, *Science*, **305**, 217, doi: 10.1126/science.1097540.
16. Osipova, D. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2009) C1473G polymorphism in mouse tph2 gene is linked to tryptophan hydroxylase-2 activity in the brain, intermale aggression, and depressive-like behavior in the forced swim test, *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1168-1174, doi: 10.1002/jnr.21928.
 17. Bazhenova, E. Y., Bazovkina, D. V., Kulikova, E. A., Fursenko, D. V., Khotskin, N. V., Lichman, D. V., and Kulikov, A. V. (2017) C1473G polymorphism in mouse tryptophan hydroxylase-2 gene in the regulation of the reaction to emotional stress, *Neurosci. Lett.*, **640**, 105-110, doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.010.
 18. Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., Kulikova, E. A., Khotskin, N. V., Sinyakova, N. A., and Kulikov, A. V. (2019) Effect of photoperiodic alterations on depression-like behavior and the brain serotonin system in mice genetically different in tryptophan hydroxylase 2 activity, *Neurosci. Lett.*, **699**, 91-96, doi: 10.1016/j.neulet.2019.01.041.
 19. Bazovkina, D. V., Lichman, D. V., and Kulikov, A. V. (2015) The C1473G polymorphism in the Tryptophan hydroxylase-2 gene: involvement in ethanol-related behavior in mice, *Neurosci. Lett.*, **589**, 79-82, doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.043.
 20. Boone, E. M., Cook, M. N., Hou, X., and Jones, B. C. (1997) Sex and strain influence the effect of ethanol on central monoamines, *J. Stud. Alcohol*, **58**, 590-599, doi: 10.15288/jsa.1997.58.590.
 21. Hitzemann, B., and Hitzemann, R. (1997) Genetics ethanol and the Fos response: a comparison of the C57BL/6J and DBA/2J inbred mouse strains, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **21**, 1497-1507.
 22. Raymond, J. S., Wilson, B. B., Tan, O., Gururajan, A., and Bowen, M. T. (2019) Acute alcohol exposure dose-dependently alleviates social avoidance in adolescent mice and inhibits social investigation in adult mice, *Psychopharmacology*, **236**, 3625-3639, doi: 10.1007/s00213-019-05335-8.
 23. Ogilvie, K. M., Lee, S., and Rivier, C. (1998) Divergence in the expression of molecular markers of neuronal activation in the parvocellular paraventricular nucleus of the hypothalamus evoked by alcohol administration via different routes, *J. Neurosci.*, **18**, 4344-4352.
 24. Nevo, I., and Hamon, M. (1995) Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism, *Neurochem. Int.*, **26**, 305-342, doi: 10.1016/0197-0186(94)00139-1.
 25. Vilpoux, C., Warnault, V., Pierrefiche, O., Daoust, M., and Naassila, M. (2009) Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **33**, 945-969, doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.00916.x.
 26. Abrahao, K. P., Salinas, A. G., and Lovinger, D. M. (2017) Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits, *Neuron*, **96**, 1223-1238, doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.032.
 27. Ford, C. P. (2014) The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission, *Neuroscience*, **282**, 13-22, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.025.
 28. Slotnick, B. M., and Leonard, C. M. (1975) *A Stereotaxic Atlas of the Albino Mouse Forebrain*, U. S. Dept. of Health, Education and Welfare, Rockville, 174 p.
 29. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT_{1A} serotonin receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol. (Mosk)*, **40**, 37-44, doi: 10.1134/s0026893306010079.
 30. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008.
 31. Bazovkina, D., Naumenko, V., Bazhenova, E., and Kondaurava, E. (2021) Effect of central administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on behavior and brain monoamine metabolism in new recombinant mouse lines differing by 5-HT_{1A} receptor functionality, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11987, doi: 10.3390/ijms222111987.
 32. Robinson, S. L., Dornellas, A., Burnham, N. W., Houck, C. A., Luhn, K. L., Bendrath, S. C., Companion, M. A., Brewton, H. W., Thomas, R. D., Navarro, M., and Thiele, T. E. (2020) Distinct and overlapping patterns of acute ethanol-induced c-Fos activation in two inbred replicate lines of mice selected for drinking to high blood ethanol concentrations, *Brain Sci.*, **10**, 988, doi: 10.3390/brainsci10120988.
 33. Smith, M. L., Li, J., Cote, D. M., and Ryabinin, A. E. (2016) Effects of isoflurane and ethanol administration on c-Fos immunoreactivity in mice, *Neuroscience*, **316**, 337-343, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.047.
 34. McBride, W. J. (2002) Central nucleus of the amygdala and the effects of alcohol and alcohol-drinking behavior in rodents, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **71**, 509-515, doi: 10.1016/s0091-3057(01)00680-3.
 35. LeMarquand, D., Pihl, R. O., and Benkelfat, C. (1994) Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies, *Biol. Psychiatry*, **36**, 395-421, doi: 10.1016/0006-3223(94)91215-7.
 36. Badawy, A. A. (2002) Tryptophan metabolism in alcoholism, *Nutr. Res. Rev.*, **15**, 123-152, doi: 10.1079/NRR200133.
 37. Siesser, W. B., Zhang, X., Jacobsen, J. P., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2010) Tryptophan hydroxylase 2 genotype determines brain serotonin synthesis but not tissue content in C57Bl/6 and BALB/c congenic mice, *Neurosci. Lett.*, **481**, 6-11, doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.035.
 38. Berger, S. M., Weber, T., Perreau-Lenz, S., Vogt, M. A., Gartside, S. E., Maser-Gluth, C., Lan-

- fumey, L., Gass, P., Spanagel, R., and Bartsch, D. (2012) A functional Tph2 C1473G polymorphism causes an anxiety phenotype via compensatory changes in the serotonergic system, *Neuropsychopharmacology*, **37**, 1986-1998, doi: 10.1038/npp.2012.46.
39. Kirby, L. G., Zeeb, F. D., and Winstanley, C. A. (2011) Contributions of serotonin in addiction vulnerability, *Neuropharmacology*, **61**, 421-432, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.03.022.
40. Kelaï, S., Renoir, T., Chouchana, L., Saurini, F., Hanoun, N., Hamon, M., and Lanfumey, L. (2008) Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT_{1A} autoreceptors in C57BL/6J mice, *J. Neurochem.*, **107**, 1660-1670, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05733.x.
41. Melis, M., Diana, M., Enrico, P., Marinelli, M., and Brodie, M. S. (2009) Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress, *Alcohol*, **43**, 531-539, doi: 10.1016/j.alcohol.2009.05.004.
42. Weinshenker, D., and Schroeder, J. P. (2007) There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction, *Neuropsychopharmacology*, **32**, 1433-1451, doi: 10.1038/sj.npp.1301263.
43. Tang, A., George, M. A., Randall, J. A., and Gonzales, R. A. (2003) Ethanol increases extracellular dopamine concentration in the ventral striatum in C57BL/6 mice, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **27**, 1083-1089, doi: 10.1097/01.ALC.0000075825.14331.65.
44. Sinyakova, N. A., Bazhenova, E. Y., Kulikova, E. A., Fursenko, D. V., and Kulikov, A. V. (2020) Effect of the C1473G polymorphic variant of the tryptophan hydroxylase 2 gene and photoperiod length on the dopamine system of the mouse brain [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **54**, 60-68, doi: 10.31857/S0026898420010140.

THE ROLE OF C1473G POLYMORPHISM IN TRIPTOPHANHYDROXYLASE-2 GENE IN THE ACUTE ETHANOL EFFECTS ON *c-fos* GENE EXPRESSION AND METABOLISM OF BIOGENIC AMINES IN BRAIN OF MICE

D. V. Bazovkina*, D. V. Fursenko, V. S. Naumenko, and A. V. Kulikov

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: daryabazovkina@gmail.com*

Tryptophan hydroxylase-2 is a key enzyme in the synthesis of the neurotransmitter serotonin, which plays an important role in the mechanisms of regulation of a wide range of physiological functions and behaviors. In this work, we studied the effect of acute ethanol administration on the expression of the *c-fos* early response gene and the metabolism of serotonin and catecholamines in the brain structures of B6-1473C and B6-1473G congenic mice, which differ in the C1473G single-nucleotide substitution in the Tph2 gene and enzyme activity. Acute alcoholization led to a significant increase in *c-fos* gene expression in the frontal cortex and striatum of B6-1473G mice and the hippocampus of B6-1473C mice. The introduction of ethanol caused a decrease in the index of serotonin metabolism in the nucleus accumbens in B6-1473C mice, as well as in the hippocampus and striatum of B6-1473G mice. Also, ethanol led to a decrease in the level of norepinephrine in the hypothalamus in B6-1473C mice. Thus, the C1473G polymorphism in the Tph2 gene has a significant effect on changes in the *c-fos* gene expression pattern and metabolism of biogenic amines in the brain induced by acute ethanol administration.

Keywords: ethanol, C1473G polymorphism, tryptophan hydroxylase-2, *c-fos* gene, serotonin, dopamine, norepinephrine, mouse

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ФАРМАКОТЕРАПИИ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА: БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Обзор

© 2023 И.С. Бокша*, Т.А. Прохорова, О.К. Савушкина, Е.Б. Терешкина, Г.Ш. Бурбаева

ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»,
115522 Москва, Россия; электронная почта: boksha_irina@mail.ru

Поступила в редакцию 01.11.2022

После доработки 24.11.2022

Принята к публикации 25.11.2022

Расстройства аутистического спектра (РАС) — это высоко гетерогенные нейроонтогенетические заболевания, вызываемые сложным взаимодействием многочисленных генетических факторов и факторов внешней среды, приводящим к нарушениям формирования нервной системы на ранних этапах развития. В настоящее время отсутствуют общепринятые фармакологические методы лечения нарушений социальной коммуникации и ограниченных и повторяющихся моделей поведения, так называемых ядерных симптомов РАС. В качестве причин неудач клинических испытаний фармакотерапии РАС рассматриваются, в частности, недостаток знаний о биологических основах РАС, отсутствие клинически значимых биохимических параметров, отражающих нарушение сигнальных молекулярных каскадов, управляющих развитием и функционированием нервной системы, и отсутствие методов выделения гомогенных по клиническим и биологическим показателям подгрупп больных. В настоящем обзоре рассмотрены возможности применения дифференцированного клиничко-биологического подхода к целевому поиску фармакотерапии РАС с акцентом на биохимические маркеры, связанные с РАС, и попытки стратификации пациентов по биохимическим показателям. Обсуждается использование подхода «мишень-ориентированная терапия и оценка состояния мишени до лечения и в процессе лечения для возможного выделения больных с положительным ответом на лечение» на примере опубликованных результатов клинических испытаний. Сделан вывод о том, что выявление биохимических показателей для выделения подгрупп больных РАС требует проведения исследований на больших выборках, отражающих клиническое и биологическое разнообразие больных с РАС, и использования единых подходов для проведения подобных исследований. Комплексный подход, включающий клинические наблюдения, клиничко-психологическую оценку поведения пациентов, изучение анамнеза и составление индивидуальных молекулярных профилей, должен стать новой стратегией для стратификации и выделения подгрупп пациентов с РАС для клинических испытаний фармакотерапии, а также для оценки её эффективности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: расстройства аутистического спектра, фармакотерапия, биомаркеры, молекулярные мишени.

DOI: 10.31857/S0320972523030028, **EDN:** QWDYQR

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) — это гетерогенные многофакторные нарушения

развития нервной системы (нейроонтогенеза), при которых общими характеристиками фенотипа являются нарушения социального взаимодействия, общения и стереотипное поведение

Принятые сокращения: АВП — аргинин-вазопрессин; ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; МРС — магнитно-резонансная спектроскопия; 5-МТГФ — 5-метилтетрагидрофолат; ОТ — окситоцин; ОТР — рецептор окситоцина; РАС — расстройства аутистического спектра; РКИ — рандомизированные контролируемые испытания; СМЖ — спинномозговая жидкость; X-ФРА — синдром ломкой X-хромосомы; Akt — RAC- α серин-треониновая протеинкиназа; CARS — шкала оценки детского аутизма; E/I — равновесие возбуждения/торможения; FMRP — белок, ассоциируемый с синдромом ломкой X-хромосомы; FR — рецептор фолата; FRab — аутоантитела к рецептору фолата; Glx — суммарная концентрация глутамин + глутамат; 5-HT — серотонин; 5-HTT — белок-переносчик серотонина; mTOR — протеинкиназа, механистическая мишень рапамицина у млекопитающих.

* Адресат для корреспонденции.

(так называемые ядерные симптомы РАС). С клинической точки зрения, РАС представляют собой неоднородную группу расстройств, включающих различные нозологические дефиниции по Международной классификации болезней (МКБ-10): синдром Аспергера, детский аутизм, атипичный аутизм, гиперактивное расстройство, сочетающееся с умеренной умственной отсталостью и стереотипными движениями, другие дезинтегративные расстройства детского возраста — всё это обозначается в западных клиничко-биологических исследованиях термином «идиопатический аутизм». РАС также встречаются при многих хромосомных и генетических синдромах, включая моногенные, и эти формы называют синдромными РАС [1, 2].

РАС характеризуются широким диапазоном и гетерогенностью проявлений, что связано с разными этиологическими факторами и различной нейробиологической основой [3]. В клинической практике диагноз РАС выставляется на основании картины клинических симптомов без определения этиологии, а в случае синдромных форм диагноз РАС сопутствует основному и подтверждается генетическими анализами. Ключевые нейробиологические механизмы РАС при постановке диагноза определить очень сложно.

В патогенез РАС вносят вклад многочисленные генетические факторы, предопределяющие нейроонтогенетические нарушения. Также велик вклад влияния факторов внешней среды, когда сложное взаимодействие различных факторов приводит к нарушениям формирования нервной системы на ранних этапах развития. Нейробиологические нарушения включают аномальную активность сигнальных каскадов, участвующих в росте и дифференцировке нервной ткани, запуск аутоиммунных процессов, развитие окислительного стресса, нарушения функционирования и взаимодействия нейромедиаторных систем. С помощью ряда экспериментальных платформ обнаружены ключевые узлы нарушений в основных компонентах сигнальных каскадов, связанных с развитием нейронов и передачей импульсов между ними, метаболизмом и поддержанием гомеостаза, к которым «сходятся» биохимические пути или которые имеют место при различных РАС, а также с регуляцией иммунной системы и нейровоспалением [4].

Несмотря на интенсивные исследования и существенный прогресс в изучении этиологии и патогенеза РАС, на сегодняшний день отсутствуют эффективные лекарственные препараты для воздействия на ядерные симпто-

мы РАС. Возможности фармакотерапии РАС сводятся в основном к облегчению симптомов патологических состояний, сопутствующих РАС (эпилептических припадков, нарушений поведения и сна).

Недавний метаанализ данных по 41 лекарственному средству и 17 пищевым добавкам из 125 рандомизированных контролируемых испытаний (РКИ) ($n = 7450$ участников среди детей/подростков (средний возраст 8,2 года)) и 18 РКИ ($n = 1104$ участников среди взрослых (средний возраст 24,6 года)) [5] показал, что по меньшей мере один из ядерных симптомов поддается коррекции у детей/подростков действием следующих препаратов: арипипразол (трудности в общении и стереотипное поведение), атомоксетин (стереотипное поведение), буметанид (стереотипное поведение) и рисперидон (трудности в общении, стереотипное поведение). Что касается взрослых пациентов, улучшение в домене стереотипное поведение отмечалось при приеме флуоксетина, флувоксамина, окситоцина (ОТ) или рисперидона, однако рисперидон, сульфорафан, баловаптан и ОТ не оказались эффективными в отношении тяжести ядерных симптомов аутизма в целом, хотя при применении сульфорафана была отмечена тенденция к улучшению. Кроме того, были отмечены некоторые признаки улучшения при применении карнозина, галоперидола, фолиевой кислоты, гуанфацина, омега-3-жирных кислот, пробиотиков, сульфорафана, тидеглусиба и вальпроата. Достоверность этих оценок была низкой, за исключением ОТ (умеренная). Лекарства существенно различались по степени облегчения тяжести сопутствующих симптомов и побочным эффектам [5].

Таким образом, хотя некоторые лекарства из обширного списка препаратов с совершенно разными мишенями и механизмами действия и оказались способными воздействовать на ядерные симптомы, этот эффект может быть вторичным по отношению к снижению тяжести сопутствующих симптомов, а результаты исследований плохо воспроизводятся.

Исследования в области психофармакологии при РАС сталкиваются с такими основными препятствиями, как гетерогенность этиологии и, как следствие, большая межиндивидуальная вариабельность в клинических реакциях и побочных эффектах в популяции больных РАС [6] и отсутствие поддающихся количественной оценке идентифицированных и верифицированных биохимических параметров, отражающих нарушение сигнальных

молекулярных каскадов, управляющих развитием и функционированием нервной системы [7, 8]. Поэтому, очевидно, почему до сих пор отсутствует универсальный лекарственный препарат, направленный на облегчение тяжести ядерных симптомов аутизма.

В качестве причин неудач большинства клинических испытаний лекарственных препаратов для лечения основных симптомов РАС также рассматривают недостаток знаний о биологических основах РАС (т.е. отсутствие чётко определённых мишеней лечения), отсутствие объективных диагностических биомаркеров, маркеров для предсказания результата лечения и мониторинга и единых подходов к стратификации (отбору групп) больных при клинических исследованиях. Использование «универсального» подхода к лечению (т.е. применение одинаковой терапии у пациентов с недифференцированными формами РАС) и к оценке клинических изменений при лечении негативно сказывается на итогах клинических испытаний [9–15].

Кроме того, существенным аспектом биологических исследований РАС является необходимость учёта возраста больных. При постановке диагноза РАС важно определить, насколько тяжесть специфических симптомов сочетается с наличием генетических или негенетических факторов, включая функциональные показатели изменений в ЦНС, и принимать во внимание их соответствующее влияние на траекторию нервного и психического развития (гармоничность и соответствие возрастным рамкам) для того, чтобы наилучшим образом подобрать персонализированное лечение с учётом конкретных симптомов. В связи с этим подчёркивается важность биомаркеров, связанных с развитием и функционированием нервной системы и ответственных за проявление определённого фенотипа(ов) в определённые периоды развития, соответствующего возрастной норме [16].

Между тем в России и за рубежом в клинико-биологических исследованиях и испытаниях новых лекарственных препаратов в последнее время предлагается подкреплять клиническую диагностику исследованиями биомаркеров [17–22]. В частности, применение нейрорептиков при РАС, так дискутируемое в мировой детской психиатрии, в России рекомендовано лишь для узких, чётко охарактеризованных подгрупп пациентов с РАС (с диагнозами под рубрик F84.02 (детский психоз) и F84.12 (атипичный детский психоз)), причём диагнозы должны быть основаны клинически и подкреплены био-

химическими/иммунологическими/нейрофизиологическими маркерами [17, 23]. В случаях РАС, не относящихся к моногенным синдромным формам и с неустановленной этиологией, называемых в западной литературе «идиопатическими» РАС, целенаправленный фенотипический отбор групп пациентов по биохимическим показателям, хотя и трудно реализуем, но возможен.

Цель написания обзора — систематика и описание попыток применения дифференцированного клинико-биологического подхода к целевому поиску фармакотерапии РАС, при этом основной акцент сделан на биохимических путях и маркерах, связанных с РАС, и попытках стратификации пациентов по биохимическим показателям. В настоящей работе мы рассматриваем возможность использования подхода «мишень-ориентированная терапия и оценка степени отклонения от контрольных значений базовых (исходных) значений параметров, отражающих состояние мишени, и их изменение в процессе лечения» на примере опубликованных результатов клинических испытаний.

ПОИСК БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ СТРАТИФИКАЦИИ ПАЦИЕНТОВ С РАС ПЕРЕД КЛИНИЧЕСКИМИ ИСПЫТАНИЯМИ ПРЕПАРАТОВ

В настоящее время усилия по развитию клинической психофармакологии РАС направлены на: (1) выяснение нейробиологических основ РАС, поиск мишеней лечения и разработку мишень-ориентированных препаратов; (2) унификацию используемых при проведении клинических испытаний шкал для оценки симптомов и (3) рациональное планирование клинических испытаний [24, 25]. Можно выделить несколько направлений исследований: (1) поиск биомаркеров для диагностики заболевания, стратификации больных при клинических исследованиях, предсказания результата лечения и мониторинга; (2) на основании клинических и биологических признаков выделение биологических подгрупп РАС, в том числе подгрупп больных, которые с наибольшей или с наименьшей вероятностью окажутся респондерами; (3) определение приоритета молекулярных мишеней для терапевтического воздействия (использование Fail-Fast-подхода, т.е. прекращение испытания при наличии ошибки/отрицательного результата).

По первому направлению возлагаются определённые надежды на омиксные подходы [26].

Интегрированные мультиомиксные подходы в настоящее время включают метаболомику в сочетании с геномикой или метагеномикой, однако более обещающим кажется сочетание с клиническими исследованиями метаболомики и протеомики (оба направления дают информацию о функциональных аспектах РАС), хотя, конечно, омиксные исследования очень дороги и требуют большого напряжения и затрат ресурсов системы здравоохранения.

Среди отдельных биохимических маркеров в диагностических целях и для мониторинга действия фармакопрепаратов поиск ведётся по таким направлениям, как определение концентрации серотонина (5-НТ) и серотонина + N-ацетилсеротонина + мелатонина в крови и определение концентрации аргинина-вазопрессина (АВП) в спинномозговой жидкости (СМЖ) [24].

Клинико-психологические шкалы и опросники для клинической оценки состояния пациентов с РАС разнообразны и проанализированы в специальной медицинской литературе [27, 28].

Что касается рационального планирования клинических испытаний, то, как уже было сказано выше, в качестве одного из подходов можно рассматривать выделение подгрупп больных РАС, которые с большей или меньшей вероятностью дадут положительный ответ на лечение. Известны попытки разделения пациентов с идиопатическими формами РАС на фенотипические подгруппы и разработки целевых лекарств для выделенных подгрупп. Так, проводятся клинические испытания препарата STP1, разработанного фирмой «STALICLA» (США) для подгруппы больных РАС с фенотипом ASD-Phen1. Препарат STP1 сочетает в себе два вещества: ингибитор фосфодиэстеразы BPN14770 с противовоспалительными свойствами, который ранее уже был использован в клинических испытаниях на взрослых с синдромом ломкой X-хромосомы (Х-ФР) [29], и модулятор $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -котранспортера NKCC1, также исследованный ранее. Характеристики, на основании которых набиралась группа больных с РАС для испытаний препаратов фирмой «STALICLA», и результаты клинических испытаний пока не опубликованы, поэтому неизвестно, использовались ли какие-либо биохимические показатели для селективного отбора группы. В качестве биохимического показателя, который предполагалось отслеживать в ходе клинических испытаний, указано соотношение лактат/пируват в крови.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ СТРАТИФИКАЦИИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ МОНОГЕННЫХ СИНДРОМНЫХ ФОРМАХ РАС

Примером стратификации пациентов по биохимическим признакам для исследования действия фармакопрепаратов могут служить клинические испытания в случае синдромных форм РАС, где изначально обследуемые группы более гомогенны с клинической и биохимической точек зрения, чем в случае идиопатических форм. В случае моногенных синдромов, при которых психическое состояние пациентов с определённой частотой соответствует диагностическим критериям РАС, аномалии развития нервной системы связаны с мутациями в генах, кодирующих белки: FMRP (белок, ассоциируемый с Х-ФРА); MeCP2 (метил-СрG-связывающий белок 2, ассоциированный с синдромом Ретта); TSC1/TSC2 (белки комплекса туберозного склероза, гамартин и туберин) и другие и, по-видимому, разработка направленных методов лечения в данных случаях более определённа и перспективна [4]. Синдромные формы РАС встречаются значительно реже, чем идиопатические РАС, причина которых в подавляющем числе случаев не установлена. Изучение синдромных форм РАС позволит лучше понять биохимические механизмы, лежащие в основе как синдромных, так и идиопатических форм РАС, и будет способствовать разработке общих или уникальных методов лечения [4].

Примером направленного поиска фармакотерапии с использованием биохимических маркеров при синдромных формах РАС может служить исследование Х-ФРА. Синдром Х-ФРА вызывается мутацией со снижением активности экспрессии гена *FMR1*, что является в данном случае ведущей моногенной причиной аутизма. Ряд ключевых нарушений регуляции, обнаруженных в нейронах человека при Х-ФРА, например, гиперактивность сигнальных путей фосфорилирования MAPK/ERK (митоген-активируемой протеинкиназы/активируемых внеклеточными сигналами киназ) и PI3K/Akt/mTOR (фосфатидилинозитол-3-киназы/RAC-alpha серин-треониновой протеинкиназы, механистической мишени рапамицина у млекопитающих) воспроизводится в форменных элементах крови, что подтверждает возможность использования последних для биохимического моделирования этого синдрома. Определение концентрации белка FMRP в лимфоцитах, тромбоцитах или

волосяных фолликулах пациентов с Х-ФРА позволило обнаружить связь концентрации FMRP с уровнем интеллекта, оцененным в тесте Векслера [30]. При Х-ФРА в тромбоцитах более чем в 1,5 раза усилено фосфорилирование ERK и Akt по сравнению с контролем, что подтверждает регуляцию белком FMRP этих сигнальных путей [31] и, что важно, обнаружены отрицательные корреляции между уровнями фосфорилирования ERK и Akt и когнитивными функциями по тесту Векслера. Кроме того, при Х-ФРА обнаружена корреляция степени усиления фосфорилирования ERK и Akt с концентрацией FMRP в тромбоцитах: в подгруппе с крайне низким, не поддающимся обнаружению, уровнем тромбоцитарного FMRP фосфорилирование ERK и Akt усилено более чем вдвое, а у индивидуумов-мозаиков, сохраняющих некоторый уровень синтеза FMRP и измеримую его концентрацию, степень фосфорилирования ERK и Akt неотличима от контроля [31]. Лечение ловастатином за 3 месяца корректировало гиперактивацию ERK в тромбоцитах пациентов с Х-ФРА [32]. Однако в другом контролируемом испытании ловастатина не наблюдалось значительных отличий ни в одном из изученных маркеров (матриксной металлопротеиназы 9, ERK1/2 и рибосомальной протеинкиназы S6 бета-1) как в процессе лечения, так и между группами ловастатина и плацебо [33].

Известна попытка применения параметров белкового фосфорилирования в качестве биохимического маркера при испытании действия препаратов в целях предикции терапевтического ответа на лекарство, влияющее на активность рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Например, оценка фосфорилирования ERK в клинических исследованиях рилузола [32], оказывающего ингибирующее действие на высвобождение глутамата и подавляющего его эксайтотоксичность.

Важный вывод аналитического обзора отклонений при РАС активности сигнальных каскадов фосфорилирования, затрагивающих путь mTOR и контролирующих такой глобальный процесс, как интенсивность трансляции белка, состоит в том, что при разных формах РАС (как синдромных, так и идиопатических) регистрируются изменения активности систем сигнальных каскадов, которые имеют различную направленность (усиление или, наоборот, подавление активности сигналинга) [4]. Поэтому, очевидно, невозможно ожидать, что один и тот же препарат, нацеленный на одну и ту же мишень, окажет одинаковый эффект при разных формах РАС. Даже в случаях синдром-

ных моногенных форм РАС фенотипическая выраженность (степень биохимических нарушений) у разных индивидуумов сильно варьирует, и вариации определяются не только генетическими аномалиями, но также условиями развития индивидуума и влиянием факторов среды при внутриутробном и постнатальном развитии. При этом генетические обследования проводятся в лучшем случае лишь у немногочисленной доли пациентов, обычно в случае синдромных форм РАС, и глубина генетических анализов зависит от степени развития здравоохранения страны, где проводится исследование.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ СТРАТИФИКАЦИИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКИХ ФОРМАХ РАС

Фолат. Как было показано в недавних метаанализах [5, 34], некоторые улучшения ядерных симптомов РАС наблюдаются при лечении фолиевой кислотой.

Фолиевая кислота — водорастворимый витамин В9 (N-4-2-амино-4-окси-6-птеридилметил-аминобензоил-L-глутаминовая кислота) [35, 36]. Фолат необходим для обмена одноуглеродных фрагментов, имеющего важное значение для многих внутриклеточных процессов, и метаболизируется до основного метаболита 5-метилтетрагидрофолата (5-МТГФ). Дефицит фолата в период внутриутробного и неонатального развития может приводить к нарушениям в развитии мозга и вызывать структурные отклонения, проявляющиеся в виде симптомов церебральной фолатной недостаточности или сниженной концентрации 5-МТГФ в СМЖ, при этом в крови может и не наблюдаться отклонений в концентрации этого метаболита. В редких случаях причиной развития фолатной недостаточности могут быть мутации гена рецептора фолата (FR) [37], но наиболее частая причина, приводящая к снижению уровней фолата в СМЖ — наличие аутоантител к рецептору фолата (FRab), способных блокировать перенос фолата через гематоэнцефалический барьер [35, 38]. Направленный поиск дефектов в гене, кодирующем FR, у пациентов с РАС их не выявил, но были отмечены сниженные уровни фолата в СМЖ [39] и, как показали проведенные разными группами учёных исследования, в крови более чем половины больных РАС содержатся FRab [40–44]. Было высказано предположение, что дети/подростки с РАС и повышенным уровнем FRab в крови

могут представлять определённую подгруппу больных и гипотетически могут быть респондерами при применении фармакотерапии фолатом.

Активная форма фолиевой кислоты — фолиниевая кислота — проникает через гематоэнцефалический барьер посредством переносчика восстановленного фолата в тех случаях, когда аутоантитела блокируют FR. Проведённое плацебо-контролируемое исследование действия фолиниевой кислоты или лейковорина (фолинат кальция) в высокой дозе (2 мг/кг в день, максимально — 50 мг в день) показало достоверное улучшение речевого общения и коррекцию стереотипного поведения при РАС. Эффект был более выражен у детей с достоверно регистрируемыми FRab [45, 46]. К сожалению, в данном исследовании не анализировалась корреляция между тяжестью симптомов РАС и наличием FRab. Но есть данные о том, что при лечении в течение 12 недель низкими дозами (в среднем 0,48 мг/кг в день) фолиниевой кислоты связи между изменением баллов по шкале ADOS в процессе лечения и уровнем FRab не обнаружено [43]. Ещё одним ограничением исследований [47, 48], о котором упоминают сами авторы, является то, что стабильность 5-МТГФ и нарушение транспорта фолата в мозг также могут быть связаны с митохондриальной дисфункцией (или снижением концентрации АТФ), которая в данном случае не изучалась [46, 49].

Что касается снижения концентрации фолата в СМЖ, обнаруженного в предварительных поисковых исследованиях, то результаты лонгитюдных исследований не выявили ни изменения концентрации 5-МТГФ во времени, ни её корреляции с клиническими проявлениями аутизма, поэтому было высказано предположение, что концентрация 5-МТГФ в СМЖ не может служить биомаркером РАС [50].

Возможно, терапевтический эффект высоких доз лейковорина связан с положительным опосредованным действием, в любом случае для выяснения вопроса требуются дополнительные исследования фолата, и авторы предполагают рациональность предварительного отбора подгрупп по биохимическим признакам [51].

Нейропептиды. Среди наиболее перспективных препаратов для терапии идиопатических РАС названы нейропептиды, регулирующие социальные функции, окситоцин и аргинин-вазопрессин [6, 34].

Окситоцин. Ядерные симптомы РАС — это нарушения социального взаимодействия и общения. Важную роль в социальном поведении человека, особенно при решении социокоммуникативных задач, играет ОТ [52]. Это под-

твердили результаты исследования с применением функциональной МРТ, показывающие дифференциальную реакцию мозга на социальные стимулы после однократного интраназального введения ОТ [52].

Нейропептид ОТ в основном продуцируется в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса. Свои основные функции ОТ реализует через специфические окситоциновые рецепторы (ОТР), которые принадлежат к семейству сопряжённых с G-белками рецепторов. К этому же семейству относятся 3 структурно родственных рецептора АВП (V1aR, V1bR и V2R). Все эти рецепторы с разным сродством связываются с ОТ и АВП и вызывают разные ответы.

Уровень экспрессии ОТР является критическим фактором, определяющим реакцию на ОТ в головном мозге, и непосредственно влияет на поведенческие реакции и социальные черты [53]. Известно, что риск развития РАС связан с наличием полиморфизмов в гене, кодирующем ОТР [54–63], однако ни в одном клиническом испытании ОТ не сообщается о предварительном генотипировании пациентов. Кроме того, установлена связь между метилированием гена рецептора ОТ и симптомами РАС [64].

При связывании ОТР с агонистом активируется фосфолипаза C (изоформа C-β, PLCβ), что приводит к гидролизу фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) и образованию инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3) и 1,2-диацилглицерина (DAG). IP3 мобилизует кальций из внутриклеточных запасов, а DAG активирует протеинкиназу C, что приводит к фосфорилированию ряда целевых белков. В зависимости от специфических G-белков, активируемых ОТ, могут активироваться разные внутриклеточные пути, регулирующие синтез белка, высвобождение нейромедиаторов, процесс гиперполяризации нейронов, равновесие возбуждения/торможения (E/I). ОТ также взаимодействует с другими нейрохимическими системами мозга [65–67].

ОТ и его влияние на социальное функционирование и стереотипное поведение активно изучается на разных возрастных группах больных РАС. У пациентов с РАС в плазме и слюне наблюдается изменение уровня эндогенного ОТ по сравнению с контролем, а метаанализ Moerkerke et al. [68] показал, что уровни эндогенного ОТ ниже у детей (7 ± 2 года) с РАС по сравнению с контрольной группой. Однако в подростковом возрасте (15 ± 2 года) и во взрослой популяции (старше 20 лет) различия с контролем не выявлены, что подтверждает

необходимость дальнейших исследований возможностей применения ОТ для терапии социального дефицита при РАС. Стратификация пациентов по биохимическим критериям могла бы принести пользу в этом направлении, особенно если удастся ответить на вопрос, связано ли различное влияние ОТ на взрослых и детей с такими показателями, как уровень эндогенного ОТ в плазме и паттерны экспрессии рецептора ОТ в мозге [69].

Определение уровня ОТ в крови было использовано в некоторых двойных слепых рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях [70], где применили стратификацию пациентов по уровню ОТ, правда, уже после проведенного исследования. Авторы проверяли эффективность и переносимость 4-недельного интраназального лечения ОТ у 32 детей с РАС в возрасте 6–12 лет. Когда в статистическую модель были включены концентрации этого нейропептида, измеренные до лечения, было обнаружено, что применение ОТ, по сравнению с плацебо, значительно улучшило социальные навыки детей с РАС по шкале социальной отзывчивости (Social Responsiveness Scale SRS™-2), но не повлияло на стереотипии и тревожность. Важно отметить, что определение концентрации ОТ в крови до лечения помогало предикции терапевтического ответа: у детей с самыми низкими концентрациями ОТ наблюдалось максимальное улучшение социальных навыков. Кроме того, улучшение социального функционирования наблюдалось у пациентов, у которых концентрации ОТ в крови повысились после лечения. Это позволяет предположить, что основой улучшения может быть повышение секреции эндогенного ОТ. Результаты показывают, что лечение ОТ улучшает социальные способности у детей с РАС и что наибольшего эффекта от лечения ОТ можно достичь у пациентов с дефицитом активности ОТ-зависимой сигнальной системы до лечения. На основании этих результатов очевидна необходимость биохимической стратификации пациентов по этому признаку перед назначением терапии.

В проведенном с участием 34 взрослых мужчин с РАС исследовании влияния 4-недельного курса интраназального введения ОТ на эндогенные уровни ОТ в слюне было показано, что приём ОТ достоверно увеличивал уровень эндогенного ОТ в слюне сразу после лечения и спустя 4 недели после лечения, что указывает на взаимодействие между экзогенно введенным ОТ и его эндогенной продукцией [71]. Примечательно, что более сильное повышение концентрации ОТ в слюне после

лечения было связано с более выраженными улучшениями социального функционирования (SRS-A), но не было значимо связано с коррекцией повторяющегося/стереотипного поведения. Эти результаты показывают, что положительное влияние ОТ на социальное функционирование может привести к самоподдерживающемуся повышению уровня ОТ за счёт запуска его продукции и высвобождения [72].

Начато проведение многоцентрового исследования ОТ при РАС для улучшения социального поведения (SOARS-B), включающее 290 участников 3–17 лет [73]. Оценка результатов лечения должна будет проведена через 4 недели после завершения курса приема ОТ. В процессе исследования планируется тестирование по разным психометрическим шкалам, определение концентраций ОТ и серотонина в сыворотке крови, определение степени метилирования гена рецептора ОТ, оценка уровня экспрессии гена окситоцина по мРНК в начале исследования и на 8, 24 и 36 неделе для изучения потенциальных взаимосвязей между этими показателями и клинической реакцией на лечение.

Имеются данные о том, что ОТ тесно связан с кишечным микробиомом через иммунно-эндокринно-мозговые сигнальные сети [74]. Лечение пробиотиками *Lactobacillus reuteri* избирательно восстанавливает социальный дефицит за счёт индукции эндогенного ОТ [75]. Обнаружена интересная связь между уровнями ОТ в сыворотке и представленностью микробиоты (с присутствием определённых микроорганизмов) у детей с РАС [76]. Показано, что наблюдаются достоверные различия между здоровыми и больными детьми с РАС в представленности микробиоты. Кроме того, среди мальчиков с РАС с наиболее низкими уровнями ОТ в сыворотке крови были наиболее выражены проблемы с кишечником. Таким образом, измерение уровней ОТ может играть важную роль в выявлении потенциальных подтипов РАС и быть использовано для прогнозирования ответа на лечение.

Аргинин-вазопрессин. Было показано, что средняя концентрация нейропептида АВП в СМЖ ниже у детей с РАС по сравнению с контрольной группой, и было высказано предположение о том, что концентрация АВП в СМЖ может быть маркером социального дефицита при аутизме [77]. При этом концентрация АВП в крови коррелирует с концентрацией этого нейропептида в СМЖ [78]. Однако в исследованиях эффективности назальной формы АВП у пациентов с РАС обнаружено,

что лучшие результаты лечения были у участников с наивысшими концентрациями АВП в крови до лечения [70]. Для объяснения этого факта было высказано предположение о том, что пациенты-участники с более низкими концентрациями эндогенного АВП получали «недостаточную дозу», с точки зрения количества препарата или продолжительности лечения, и, следовательно, не получили той пользы от введения АВП, которую получили пациенты с более высокими концентрациями АВП.

В настоящее время проводятся испытания назальной формы вазопрессина (фазы 2 и 3 в США), и результаты ожидаются в 2024 году [79]. В данном клиническом испытании для изучения возможностей предикции эффективности лечения прописано определение концентрации эндогенного вазопрессина перед началом испытания.

Таким образом, предварительная стратификация пациентов перед началом клинических испытаний по перечисленным биохимическим признакам проводилась нечасто. Дифференцирование пациентов в основном проводилось после проведенных исследований, однако полученные при этом данные и обнаруженные связи могут свидетельствовать в пользу подхода с предварительной стратификацией. При проведении дальнейших клинических испытаний данный подход представляется рациональным. Корреляции между биохимическими показателями и данными психометрических оценок анализировались крайне редко, вероятно, ввиду трудности организации и проведения подобных клинико-биологических исследований.

ГАМК и глутамин/глутамат. В современной литературе нарушение равновесия процессов Е/І в ЦНС рассматривается в качестве одной из первичных нейробиологических основ и нейропатофизиологического механизма по меньшей мере у определённой подгруппы больных РАС. Предполагают, что наличие дисбаланса Е/І (по данным нейровизуализации) потенциально может быть использовано для выделения биохимических подтипов среди больных РАС при выборе лечения и проведения клинических испытаний [80].

Для прямой неинвазивной оценки *in vivo* глутамата и ГАМК, основных возбуждающего и тормозного нейромедиаторов в ЦНС, как правило, используют магнитно-резонансную спектроскопию (МРС). Предполагают, что неинвазивные анализы ткани головного мозга наиболее точны, поскольку уровни глутамата и ГАМК в плазме крови могут не точно отражать концентрации нейромедиаторов в мозге,

несмотря на то что есть исследования, в которых выявлена достоверная корреляция между уровнем глутамата в крови и уровнем глутамата в головном мозге у детей с РАС [81]. Показано, что средние концентрации глутамата в крови и головном мозге у пациентов с РАС значительно превосходят контрольные значения ($p < 0,001$), была также выявлена высокодостоверная положительная корреляция между уровнем глутамата в крови и уровнем глутамата в четырёх тестируемых областях головного мозга ($p < 0,001$).

Буметанид — «петлевой» диуретик, ингибитор $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -котранспортера NKCC1. При моделировании на животных аутистического поведения буметанид изменял Е/І в синапсах, усиливая действие ГАМК и тем самым уменьшая тяжесть проявления аутизма [80]. Были проведены клинические испытания буметанида, в которых изучались клинические и нейрохимические параметры пациентов с РАС, включая метаболизм глутамата и ГАМК, исследованные методом МРС [82]. Группу из 83 пациентов с РАС рандомизировали в подгруппу буметанида (0,5 мг/2 раза в день) или контрольную подгруппу и изучали динамику как клинических показателей по шкале оценки детского аутизма (CARS) и шкале общего клинического впечатления (CGI), так и биохимических параметров — пиков (сигналов), соответствующих ГАМК и суммарному сигналу от глутамин и глутамат (Glx), при МРС в островковой доле и зрительной коре. По сравнению с контрольной подгруппой в подгруппе, пролеченной буметанидом, наблюдалось значительное и достоверное снижение тяжести симптомов, о чём свидетельствовала сумма баллов по CARS. Снижение тяжести клинических симптомов было подтверждено оценками по CGI. Отношение сигнала ГАМК к сигналу Glx снижалось сильнее в подгруппе буметанида, чем в контрольной, и это снижение было связано со снижением тяжести симптомов в подгруппе буметанида. Исследование подтвердило клиническую эффективность буметанида в облегчении ядерных симптомов РАС у детей 3–6 лет и впервые напрямую показало, что улучшение связано со снижением отношения сигналов ГАМК/Glx. Это исследование предполагает, что отношение сигналов ГАМК/Glx, измеренное МРС, может служить биомаркером нейровизуализации для оценки эффективности лечения буметанидом [83], хотя, конечно, МРС не всегда доступна по экономическим соображениям и сопряжена с этическими сложностями (для её проведения требуется анестезия пациентов).

Рецепторы ГАМК также рассматривались как потенциальная мишень для терапии РАС. Так, исследования префронтальной коры мозга посредством МРС на ядрах протонов [84] на группе взрослых с высокофункциональным аутизмом показали, что действие рилузола различно у пациентов с РАС и в контрольной группе: у пациентов рилузол увеличивал отношение сигналов ГАМК/Glx, а в контрольной группе — уменьшал. Проводится рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое испытание AZD7325 избирательного агониста рецептора ГАМК-A, активирующего субъединицы $\alpha 2$ и $\alpha 3$ и обладающего анксиолитическим действием, также на группе взрослых пациентов с высокофункциональным аутизмом [85]. Поскольку клинические испытания, проводимые в настоящее время, нацелены на глутаматергическую и ГАМК-ергическую системы (арбаклофен, мемантин, каннабидиол, каннабидиварин), то маркеры, характеризующие активность этих систем и оцениваемые с помощью МРС или других показателей, например, активность гамма-диапазона ЭЭГ, кажутся весьма значимыми [86].

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ИССЛЕДУЕМЫЕ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ СТРАТИФИКАЦИИ ПАЦИЕНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАС

Иммунохимические показатели. Проведённые исследования показали, что концентрации белков иммунной системы (цитокинов, хемокинов и факторов роста) в сыворотке крови и СМЖ не отражают состояние ЦНС и микроокружение нейроиммунной системы из-за значительной вариабельности концентраций этих иммунологических показателей и отсутствия их стабильности во времени при измерении у одного и того же ребенка [87]. Также не было обнаружено достоверных различий в концентрациях циркулирующих цитокинов и хемокинов между детьми с РАС и контрольной группой [88]. Результаты исследований не подтвердили гипотезу о том, что активный системный воспалительный процесс играет роль в персистенции РАС и позволили предположить, что ранее наблюдаемое повышение уровня цитокинов и хемокинов в тканях головного мозга [89] могло отражать вторичную гомеостатическую невоспалительную реакцию на дисфункцию ЦНС [90].

Тем не менее исследования возможности использования иммунохимических показателей для выделения подгрупп пациентов с РАС

продолжаются. Например, при испытаниях буметанида стратификация пациентов по таким параметрам, как концентрация интерлейкинов, позволила разделить пациентов на подгруппы с хорошим, умеренным и слабым эффектами от применения буметанида [91]. Было показано, что улучшение клинических симптомов при лечении буметанидом детей с РАС связано с характером изменений уровней трёх цитокинов, а именно интерферона- γ (IFN- γ), MIG (монокина, индуцированного интерфероном- γ) и интерферона- $\alpha 2$ (IFN- $\alpha 2$). На основании этого было высказано предположение, что исходные концентрации этих цитокинов, наряду с использованием поведенческих оценок, могут улучшить прогнозирование ответа на буметанид.

Ранее сообщалось, что у пациентов с РАС более высокий, по сравнению с контролем, уровень IFN- γ в головном мозге [92], СМЖ [89], плазме [93] и мононуклеарных клетках периферической крови [94]. Получены данные об ингибировании IFN- γ секреции хлоридов [95] и подавлении экспрессии NKCC1 [95, 96] и $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-АТР}$ азы [96], которые вовлечены в ГАМКергическую дисфункцию при РАС [95]. Следовательно, иммунная система может быть вовлечена в механизм восстановления функционирования ГАМКергической системы под действием буметанида при РАС.

В России сертифицированы и запатентованы нейроиммунологические маркеры, которые предложено ввести в клиническую практику в поддержку клинической дифференциальной диагностики РАС [27]. В диагностические тесты включено определение в крови пациентов ферментативной активности лейкоцитарной эластазы и альфа1-протеиназного ингибитора, уровня аутоантител к нейроспецифическим белкам S-100 бета и основному белку миелина [23].

Серотонин (5-гидрокситриптамин). О биологических основах РАС к настоящему моменту известно немного, но гипотеза об участии 5-НТ в развитии нервной системы при РАС является одной из самых ранних. 5-НТ участвует в регуляции таких сложных процессов, как обучение, память, настроение, социальные взаимодействия, сон и аппетит. Известно, что изменение уровня 5-НТ влияет на развитие мозга и вызывает беспокойство, депрессию, снижение социальных контактов и другие симптомы, близкие по проявлению к тем, которые наблюдаются у пациентов с РАС. Такое разнообразие функций 5-НТ связано с наличием большого количества рецепторов, которые регулируют различные клеточные сигнальные пути, например, сигнальный путь ERK, mTOR

и циклинзависимой киназы 5 (Cdk5). Большинство серотониновых рецепторов относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белком, ряд рецепторов 5-НТ являются катионными каналами. Известно, что семейство рецепторов 5-НТ1 опосредует своё действие через ингибирование аденилатциклазы и снижение концентрации сАМР; семейство 5-НТ2 активирует фосфолипазу С, и рецепторы 5-НТ4, 5-НТ6 и 5-НТ7 активируют аденилатциклазу и повышают содержание сАМР. Активация рецепторов связана с процессами гиперполяризации и деполяризации нейронов [97].

Концентрация серотонина контролируется трансмембранным белком-переносчиком серотонина (5-НТТ) [98]. Обратный захват 5-НТ посредством 5-НТТ является основным путём снижения внеклеточного уровня 5-НТ в головном мозге и маркером системы 5-НТ, но исследования 5-НТТ и системы 5-НТ *in vivo* при РАС немногочисленны. Количественная оценка возможных изменений системы 5-НТ при РАС проведена с помощью позитронно-эмиссионной томографии с радиоактивным лигандом [¹¹C] MADAM для измерения доступности 5-НТТ в мозге 15 взрослых с РАС (19–48 лет) и 15 лиц контрольной группы [99]. Кроме того, исследованы корреляции между региональной доступностью 5-НТТ и оценками поведенческого фенотипа в отношении основных симптомов РАС. В группе с РАС обнаружена достоверно пониженная доступность 5-НТТ в стволе мозга и в 9 из 18 исследованных областей серого вещества. Кроме того, было обнаружено несколько корреляций между региональной доступностью 5-НТТ и результатами социальных когнитивных тестов. Результаты подтверждают гипотезу о том, что доступность 5-НТТ снижена в мозге взрослых людей с РАС, и согласуются с теорией участия 5-НТ в нарушении развития нервной системы при РАС. Полученные данные подтверждают центральную роль 5-НТ в физиологии РАС и указывают на необходимость дальнейшего изучения системы 5-НТ при РАС.

В качестве маркеров, которые могут иметь значение для выделения подгрупп пациентов и определения эффективности лечения, рассматривались концентрации 5-НТ в крови и генетические полиморфизмы, влияющие на активность серотонинергической системы [100, 101], включающей переносчики и рецепторы 5-НТ [102–106], причём в последней цитированной статье сообщается о том, что снижение концентрации 5-НТ в поясной извилине у больных с аутизмом коррелирует с выраженностью дефицита социальных функций.

Обнаружено, что при идиопатических формах РАС происходит нарушение метаболизма 5-НТ [107], регистрируемое по изменению концентрации 5-НТ в крови пациентов [108], причём около трети обследованных пациентов с РАС имели повышенный уровень 5-НТ в крови [109].

Это послужило толчком к испытанию препаратов — ингибиторов обратного захвата 5-НТ (а также норадреналина и других препаратов с известным антидепрессантным действием), но прорыва на данном направлении не произошло [6]. При исследованиях эффективности селективных ингибиторов обратного захвата 5-НТ (СИОЗС) при РАС получены противоречивые результаты. В целом СИОЗС хуже переносятся детьми с РАС, чем взрослыми, и менее эффективны у детей. В настоящее время проводятся исследования препарата антидепрессанта тианептина, который усиливает обратный захват 5-НТ нейронами коры головного мозга и гиппокампа и относительно слабее влияет на дофаминовую и норадреналиновую системы в ЦНС. В качестве биологического маркера используется функциональная активность мозга во время решения задач целенаправленной регуляции поведения, и с помощью этого метода удалось продемонстрировать позитивные результаты от однократного введения тианептина [110].

Причины повышенного уровня серотонина при РАС обусловлены не только генетически. Поскольку за 90% уровня 5-НТ, определяемого в крови, отвечает его синтез кишечными энтерохромаффинными клетками, было высказано предположение, что более высокие уровни 5-НТ у детей с РАС могут быть вызваны желудочно-кишечной гиперсекрецией 5-НТ [111]. К этому могут также иметь отношение инфекции, нарушения желудочно-кишечной микрофлоры и иммунной системы [112, 113].

В настоящее время ведутся исследования в области разработки препаратов, влияющих на определённые типы серотониновых рецепторов. Разработаны избирательные лиганды 5-НТР для лечения психических расстройств, мигрени и расстройств пищевого поведения. Часть препаратов проходит клинические испытания, и, возможно, некоторые окажутся полезными в терапии РАС [97].

Наконец, изучается стратегия частичного подавления активности транспортера серотонина без полной её блокировки [114]. Например, применение ингибитора р38α МАРК может нормализовать клиренс 5-НТ в гиппокампе и улучшить основные и сопутствующие фенотипы, присутствующие в моделях

РАС [114]. Это одно из будущих направлений исследования 5-НТ при аутизме.

Триптофан (Trp) — незаменимая для организма человека аминокислота, является предшественником 5-НТ. Снижение уровня Trp в нервной ткани влечёт за собой изменение функционирования митохондрий, снижение синаптической пластичности, аномалии развития нейронов и их морфологии, и, вероятно, может обуславливать депрессию, раздражительность и другие симптомы у больных РАС [48]. Наоборот, нормализация потребления Trp гипотетически может ослабить проявление упомянутых симптомов у пациентов с РАС. В опытах по социальному поведению животных острый дефицит Trp снижал уровень 5-НТ в мозге, что сопровождалось расстройством социального поведения, а после приёма Trp социальное поведение нормализовалось [115]. Нарушение метаболизма Trp у пациентов с РАС может влиять на раннее развитие мозга, развитие митохондрий и активность иммунной системы, что впоследствии, вероятно, приводит к аномальному развитию нейронов, особенно в лобно-височной доле и лимбической системе, и это может рассматриваться как невропатологическая основа развития РАС [116]. Обнаружено, что экспрессия гена *TRH2*, кодирующего триптофангидроксилазу 2 (фермент, лимитирующий скорость синтеза 5-НТ), снижена в мозге больных аутизмом [116, 117].

Основные пути метаболизма триптофана в желудочно-кишечном тракте: (1) микробиологический путь или прямая трансформация Trp в ряд метаболитов (триптамин, индол, индолуксусную кислоту, включая лиганды рецептора ароматических углеводов (AhR)) микробиотой кишечника; (2) кинурениновый (Kyn) путь в иммунных и эпителиальных клетках с участием индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO1); (3) серотониновый путь в энтерохромаффинных клетках с участием триптофангидроксилазы 1. Trp играет ключевую роль в регуляции биосинтеза белка, функции иммунной системы, роста и пролиферации клеток. Истощение Trp вызывает нарушение системного гомеостаза и психические нарушения и нейроиммунологические последствия, что наблюдается при ряде заболеваний ЦНС с нейровоспалительными механизмами. Более того, нарушение метаболизма Trp влияет на уровень 5-НТ и, следовательно, повышает уязвимость ЦНС и предрасположенность к психическим заболеваниям. Среди «парафармакологических» подходов к лечению РАС дискутируется вопрос о том, помо-

жет ли облегчить симптомы аутизма решение проблем ЖКТ и нормализация кишечной микробиоты [118]. Исходя из предположения о регуляции метаболизма Trp кишечной микробиотой, стратификацию пациентов с идиопатическими РАС предлагалось проводить на основе соотношения активности ферментов, метаболизирующих Trp [118]. При РАС обнаружены изменения интенсивности и соотношения путей метаболизма Trp, а именно: в плазме и моче снижены концентрации Trp, зарегистрирована высокая активность IDO1 (оценённая по отношению Kyn/Trp) и высокие уровни 5-НТ в крови [118]. Немаловажен также вопрос о влиянии нарушения кишечной микробиоты на проницаемость гематоэнцефалического барьера при РАС, что может иметь значение при клинических испытаниях фармакопрепаратов при РАС [119].

Стратификация пациентов на основе различий в метаболизме липидов. Достоверно выделен подтип РАС, характеризующийся нарушением нормального соотношения липидов крови (гиперлипидемией и гиперхолестеринемией) [120]. Выделение нового подтипа согласуется с существованием редкой синдромной формы РАС, связанной с синдромом Смита—Лемли—Опица, характеризующимся врождённым нарушением метаболизма стерина [121], и с известным влиянием генов, отвечающих за метаболизм стерина, на развитие мозга млекопитающих. Известно, что липопротеин-липаза играет ключевую роль во время дифференцировки нейронов [122], рецептор липопротеинов низкой плотности является важным медиатором передачи нейронных сигналов [123], а пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) регулирует апоптоз нейронов [124]. Кроме того, в нескольких исследованиях было показано, что MeCP2, дисфункция которого вызывает синдром Ретта, регулирует метаболизм холестерина [125].

Интересно, что в работе Tierney et al. [126], проводимой в рамках клинического испытания NCT00298246, у детей с РАС было показано снижение синтеза холестерина, а также снижение в крови количества липопротеинов высокой плотности, аполипопротеина A1 (ApoA1) и аполипопротеина B (ApoB). При этом у каждого пятого пациента наблюдались паттерны аполипопротеинов, сходные с гиполипидемическими клиническими синдромами, и у трети пациентов уровни ApoA1 и/или ApoB были сниженными, при этом у таких детей наблюдались пониженные показатели адаптивных функций по сравнению с другими детьми с РАС [126].

Митохондриальные функции. Известно, что нарушения митохондриального метаболизма связаны с РАС [127]. Однако нет исследований, посвящённых вопросу о степени изменения/вовлечённости аномалий митохондриального метаболизма при различных формах РАС. Проведённые обширные популяционные исследования с целью выявления распространённости РАС (оценка по DSM-IV и CARS) [128] обнаружили необычно высокую распространённость митохондриальных болезней среди пациентов с РАС. Ввиду трудностей характеристики нарушений митохондриального метаболизма методом МРС пока непонятно, как эти нарушения связаны с развитием РАС [48], однако были проведены клинические испытания препаратов, действие которых направлено на митохондриальный метаболизм — убихинола (восстановленной формы коэнзима Q10, убихинона) и L-карнитина [129]. Роль L-карнитина в митохондриальном метаболизме жирных кислот и другие функции L-карнитина подробно рассмотрены в метаанализе Rossignol и Frye [48]. Было выявлено значительное улучшение показателей по CARS у пациентов, получавших L-карнитин, и это улучшение было связано с увеличением концентрации общего и свободного карнитина. Отмечены хорошая переносимость лечения и облегчение тяжести симптомов аутизма у пациентов, получавших L-карнитин в течение 6 месяцев [130], однако о предварительной стратификации пациентов по степени нарушения митохондриального метаболизма не сообщается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, выявление достоверно различающихся подгрупп в рамках диагноза РАС на основе биохимических показателей — это сложная задача, требующая, с одной стороны, больших выборок, которые оптимально отражают биологическое разнообразие больных с РАС, а, с другой стороны, единообразных подходов к клинической диагностике и определению биохимических параметров. Большинство обзоров по фармакотерапии аутизма не слишком информативно из-за того, что в пуб-

ликациях результатов оригинальных клинических испытаний препаратов и «мишень-ориентированных» поисков фармакотерапии, как правило, отсутствует биохимическая оценка степени нарушения «мишени» (отклонения параметров молекулярной «мишени» действия фармакопрепарата у пациентов с РАС от контрольных значений уравненных по возрасту типично развивающихся индивидуумов). Но не менее важно и то, что не проводится клиническая дифференциация по диагнозам внутри рубрики идиопатические/не моногенные формы РАС (в лучшем случае среди идиопатических форм выделяют синдром Аспергера), хотя, согласно МКБ-10, внутри рубрики F84 дифференцируется несколько подразделов. Поэтому необходимо объединение и сопряжение усилий специалистов клинко-психологического и биохимического/нейрохимического направлений в исследованиях РАС. Комплексный подход, включающий клинические наблюдения, клинко-психологическую оценку поведения пациентов, изучение анамнеза в сочетании с описанием состояния молекулярной «мишени» (индивидуальных молекулярных профилей), должен стать новой стратегией для стратификации и выделения подгрупп пациентов с РАС для клинических испытаний фармакотерапии. Этот подход может быть полезен для дифференциальной диагностики и прогноза заболевания РАС, для выбора применяемой фармакотерапии и оценки ее эффективности.

Вклад авторов. И.С. Бокша — разработка концепции и написание текста статьи, Т.А. Прохорова — анализ литературы и написание текста статьи, О.К. Савушкина — подбор и анализ литературы, Е.Б. Терешкина — подбор литературы и редактирование текста статьи, Г.Ш. Бурбаева — проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simashkova, N. V., Boksha, I. S., Klyushnik, T. P., Iakupova, L. P., Ivanov, M. V., and Mukaetova-Ladinska, E. B. (2019) Diagnosis and management of autism spectrum disorders in Russia: clinical-biological approaches, *J. Autism Dev. Disord.*, **49**, 3906-3914, doi: 10.1007/s10803-019-04071-4.
2. Cheng, N., Rho, J. M., and Masino, S. A. (2017) Metabolic dysfunction underlying autism spectrum

- disorder and potential treatment approaches, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 34, doi: 10.3389/fnmol.2017.00034.
3. Muhle, R. A., Reed, H. E., Stratigos, K. A., and Veenstra-VanderWeele, J. (2018) The emerging clinical neuroscience of autism spectrum disorder, *JAMA Psychiatry*, **75**, 514, doi: 10.1001/jamapsychiatry.2017.4685.
 4. Boksha, I. S., Prokhorova, T. A., Tereshkina, E. B., Savushkina, O. K., and Burbaeva, G. Sh. (2021) Protein phosphorylation signaling cascades in autism: the role of mTOR pathway, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 577-596, doi: 10.1134/S0006297921050072.
 5. Siafis, S., Çıray, O., Wu, H., Schneider-Thoma, J., Bighelli, I., Krause, M., Rodolico, A., Ceraso, A., Deste, G., Huhn, M., Fraguas, D., San José Cáceres, A., Mavridis, D., Charman, T., Murphy, D. G., Parellada, M., Arango, C., and Leucht, S. (2022) Pharmacological and dietary-supplement treatments for autism spectrum disorder: a systematic review and network meta-analysis, *Mol. Autism*, **13**, 10, doi: 10.1186/s13229-022-00488-4.
 6. Persico, A. M., Ricciardello, A., Lamberti, M., Turriziani, L., Cucinotta, F., Brogna, C., Vitiello, B., and Arango, C. (2021) The pediatric psychopharmacology of autism spectrum disorder: A systematic review – Part I: The past and the present, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **110**, 110326, doi: 10.1016/j.pnpbp.2021.110326.
 7. Port, R. G., Gaetz, W., Bloy, L., Wang, D.-J., Blaskey, L., Kuschner, E. S., Levy, S. E., Brodtkin, E. S., and Roberts, T. P. L. (2017) Exploring the relationship between cortical GABA concentrations, auditory gamma-band responses and development in ASD: Evidence for an altered maturational trajectory in ASD, *Autism Res.*, **10**, 593-607, doi: 10.1002/aur.1686.
 8. Jensen, A. R., Lane, A. L., Werner, B. A., McLees, S. E., Fletcher, T. S., and Frye, R. E. (2022) Modern biomarkers for autism spectrum disorder: future directions, *Mol. Diagn. Ther.*, **26**, 483-495, doi: 10.1007/s40291-022-00600-7.
 9. Amaral, D. G., Schumann, C. M., and Nordahl, C. W. (2008) Neuroanatomy of autism, *Trends Neurosci.*, **31**, 137-145, doi: 10.1016/j.tins.2007.12.005.
 10. Coleman, M. (2005) Advances in autism research, *Dev. Med. Child Neurol.*, **47**, 148-148, doi: 10.1017/S0012162205000277.
 11. Ecker, C., Bookheimer, S. Y., and Murphy, D. G. M. (2015) Neuroimaging in autism spectrum disorder: brain structure and function across the lifespan, *Lancet Neurol.*, **14**, 1121-1134, doi: 10.1016/S1474-4422(15)00050-2.
 12. Lombardo, M. V., Lai, M.-C., and Baron-Cohen, S. (2019) Big data approaches to decomposing heterogeneity across the autism spectrum, *Mol. Psychiatry*, **24**, 1435-1450, doi: 10.1038/s41380-018-0321-0.
 13. Masi, A., DeMayo, M. M., Glozier, N., and Guastella, A. J. (2017) An overview of autism spectrum disorder, heterogeneity and treatment options, *Neurosci. Bull.*, **33**, 183-193, doi: 10.1007/s12264-017-0100-y.
 14. Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., and Baird, G. (2008) Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, **47**, 921-929, doi: 10.1097/CHI.0b013e318179964f.
 15. Tang, S., Sun, N., Floris, D. L., Zhang, X., di Martino, A., and Yeo, B. T. T. (2020) Reconciling dimensional and categorical models of autism heterogeneity: a brain connectomics and behavioral study, *Biol. Psychiatry*, **87**, 1071-1082, doi: 10.1016/j.biopsych.2019.11.009.
 16. Beversdorf, D. Q. (2016) Phenotyping, etiological factors, and biomarkers: toward precision medicine in autism spectrum disorders, *J. Dev. Behav. Pediatr.*, **37**, 659-673, doi: 10.1097/DBP.0000000000000351.
 17. Mukaetova-Ladinska, E. B., Simashkova, N. V., Mukaetova, M. S., Ivanov, M. V., and Boksha, I. S. (2018) Autism spectrum disorders in children and adults: the experience of reserches from different countries, *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im S. S. Korsakova*, **118**, 92, doi: 10.17116/jnevro201811812192.
 18. Hong, S.-J., Valk, S. L., di Martino, A., Milham, M. P., and Bernhardt, B. C. (2018) Multidimensional Neuroanatomical subtyping of autism spectrum disorder, *Cerebral Cortex*, **28**, 3578-3588, doi: 10.1093/cercor/bhx229.
 19. Feczko, E., Balba, N. M., Miranda-Dominguez, O., Cordova, M., Karalunas, S. L., Irwin, L., Demeter, D. V., Hill, A. P., Langhorst, B. H., Grieser Painter, J., Van Santen, J., Fombonne, E. J., Nigg, J. T., and Fair, D. A. (2018) Subtyping cognitive profiles in autism spectrum disorder using a functional random forest algorithm, *Neuroimage*, **172**, 674-688, doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.12.044.
 20. Easson, A. K., Fatima, Z., and McIntosh, A. R. (2019) Functional connectivity-based subtypes of individuals with and without autism spectrum disorder, *Netw. Neurosci.*, **3**, 344-362, doi: 10.1162/netn_a_00067.
 21. Duffy, F. H., and Als, H. (2019) Autism, spectrum or clusters? An EEG coherence study, *BMC Neurol.*, **19**, 27, doi: 10.1186/s12883-019-1254-1.
 22. Tomchek, S. D., Little, L. M., Myers, J., and Dunn, W. (2018) Sensory subtypes in preschool aged children with autism spectrum disorder, *J. Autism Dev. Disord.*, **48**, 2139-2147, doi: 10.1007/s10803-018-3468-2.
 23. Simashkova, N. V., Klyushnik, T. P., and Yakupova, L. P. (2018) Clinical and biological approaches to the diagnostics and substantiation of personalized therapy in patients with autism spectrum disorders [in Russian], *Psikhiatriya*, **78**, 17-24.
 24. McCracken, J. T., Anagnostou, E., Arango, C., Dawson, G., Farchione, T., Mantua, V., McPartland, J.,

- Murphy, D., Pandina, G., and Veenstra-Vander-Weele, J. (2021) Drug development for Autism Spectrum Disorder (ASD): progress, challenges, and future directions, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **48**, 3-31, doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.05.010.
25. Díaz-Caneja, C., State, M., Hagerman, R., Jacquemont, S., Marín, O., Bagni, C., Umbricht, D., Simonoff, E., de Andrés-Trelles, F., Kaale, A., Pandina, G., Gómez-Mancilla, B., Wang, P. P., Cusak, J., Siafis, S., Leucht, S., Parellada, M., Loth, E., Charman, T., Buitelaar, J. K., Murphy, D., and Arango, C. (2021) A white paper on a neurodevelopmental framework for drug discovery in autism and other neurodevelopmental disorders, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **48**, 49-88, doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.02.020.
26. Ristori, M. V., Mortera, S. L., Marzano, V., Guerrero, S., Vernocchi, P., Ianiro, G., Gardini, S., Torre, G., Valeri, G., Vicari, S., Gasbarrini, A., and Putignani, L. (2020) Proteomics and metabolomics approaches towards a functional insight onto AUTISM spectrum disorders: phenotype stratification and biomarker discovery, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6274, doi: 10.3390/ijms21176274.
27. Klyushnik, T. P., Androsova, L. V., Simashkova, N. V., Zozulya, S. A., Otman, I. N., Shushpanova, O. V., and Brusov, O. S. (2016) Clinical and laboratory diagnosis of autism spectrum disorders in children, *Lab. Sluzhba*, **5**, 22-27, doi: 10.17116/labs20165222-27.
28. Simashkova, N. V., Koval-Zaytsev, A. A., Ivanov, M. V., and Nikitina, S. G. (2021) Diagnostic, clinical, psychopathological, psychological aspects of the examination of children with autism spectrum disorders, *Psikhiatriya*, **19**, 45-53, doi: 10.30629/2618-6667-2021-19-1-45-53.
29. Berry-Kravis, E. M., Harnett, M. D., Reines, S. A., Reese, M. A., Ethridge, L. E., Outtersen, A. H., Michalak, C., Furman, J., and Gurney, M. E. (2021) Inhibition of phosphodiesterase-4D in adults with fragile X syndrome: a randomized, placebo-controlled, phase 2 clinical trial, *Nat. Med.*, **27**, 862-870, doi: 10.1038/s41591-021-01321-w.
30. Lessard, M., Chouiali, A., Drouin, R., Sébire, G., and Corbin, F. (2012) Quantitative measurement of FMRP in blood platelets as a new screening test for fragile X syndrome, *Clin. Genet.*, **82**, 472-477, doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01798.x.
31. Pellerin, D., Lortie, A., and Corbin, F. (2018) Platelets as a surrogate disease model of neurodevelopmental disorders: insights from fragile X syndrome, *Platelets*, **29**, 113-124, doi: 10.1080/09537104.2017.1317733.
32. Pellerin, D., Çaku, A., Fradet, M., Bouvier, P., Dubé, J., and Corbin, F. (2016) Lovastatin corrects ERK pathway hyperactivation in fragile X syndrome: potential of platelet's signaling cascades as new outcome measures in clinical trials, *Biomarkers*, **21**, 497-508, doi: 10.3109/1354750X.2016.1160289.
33. Thurman, A. J., Potter, L. A., Kim, K., Tassone, F., Banasik, A., Potter, S. N., Bullard, L., Nguyen, V., McDuffie, A., Hagerman, R., and Abbeduto, L. (2020) Controlled trial of lovastatin combined with an open-label treatment of a parent-implemented language intervention in youth with fragile X syndrome, *J. Neurodev. Disord.*, **12**, 12, doi: 10.1186/s11689-020-09315-4.
34. Zhou, M. S., Nasir, M., Farhat, L. C., Kook, M., Artukoglu, B. B., and Bloch, M. H. (2021) Meta-analysis: pharmacologic treatment of restricted and repetitive behaviors in autism spectrum disorders, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, **60**, 35-45, doi: 10.1016/j.jaac.2020.03.007.
35. Ramaekers, V. Th., Segers, K., Sequeira, J. M., Koenig, M., van Maldergem, L., Bours, V., Kornak, U., and Quadros, E. V. (2018) Genetic assessment and folate receptor autoantibodies in infantile-onset cerebral folate deficiency (CFD) syndrome, *Mol. Genet. Metab.*, **124**, 87-93, doi: 10.1016/j.jmgme.2018.03.001.
36. Ramaekers, V. Th., and Quadros, E. V. (2022) Cerebral folate deficiency syndrome: early diagnosis, intervention and treatment strategies, *Nutrients*, **14**, 3096, doi: 10.3390/nu14153096.
37. Cario, H., Bode, H., Debatin, K.-M., Opladen, T., and Schwarz, K. (2009) Congenital null mutations of the FOLR1 gene: a progressive neurologic disease and its treatment, *Neurology*, **73**, 2127-2129, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c679df.
38. Ramaekers, V. T., Rothenberg, S. P., Sequeira, J. M., Opladen, T., Blau, N., Quadros, E. V., and Selhub, J. (2005) Autoantibodies to folate receptors in the cerebral folate deficiency syndrome, *N. Engl. J. Med.*, **352**, 1985-1991, doi: 10.1056/NEJMoa043160.
39. Ramaekers, V. T., Sequeira, J. M., Thöny, B., and Quadros, E. V. (2020) Oxidative stress, folate receptor autoimmunity, and CSF findings in severe infantile autism, *Autism Res. Treat.*, **2020**, 1-14, doi: 10.1155/2020/9095284.
40. Frye, R. E., Sequeira, J. M., Quadros, E. V., James, S. J., and Rossignol, D. A. (2013) Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder, *Mol. Psychiatry*, **18**, 369-381, doi: 10.1038/mp.2011.175.
41. Molloy, A. M., Quadros, E. V., Sequeira, J. M., Troendle, J. F., Scott, J. M., Kirke, P. N., and Mills, J. L. (2009) Lack of association between folate-receptor autoantibodies and neural-tube defects, *N. Engl. J. Med.*, **361**, 152-160, doi: 10.1056/NEJMoa0803783.
42. Ramaekers, V. T., Quadros, E. V., and Sequeira, J. M. (2013) Role of folate receptor autoantibodies in infantile autism, *Mol. Psychiatry*, **18**, 270-271, doi: 10.1038/mp.2012.22.
43. Renard, E., Leheup, B., Guéant-Rodriguez, R.-M., Oussalah, A., Quadros, E. V., and Guéant, J. L. (2020) Folinic acid improves the score of Autism in the EFFET

- placebo-controlled randomized trial, *Biochimie*, **173**, 57-61, doi: 10.1016/j.biochi.2020.04.019.
44. Quadros, E. V., Sequeira, J. M., Brown, W. T., Mevs, C., Marchi, E., Flory, M., Jenkins, E. C., Velinov, M. T., and Cohen, I. L. (2018) Folate receptor autoantibodies are prevalent in children diagnosed with autism spectrum disorder, their normal siblings and parents, *Autism Res.*, **11**, 707-712, doi: 10.1002/aur.1934.
 45. Frye, R. E., Slattery, J., Delhey, L., Furgerson, B., Strickland, T., Tippet, M., Sailey, A., Wynne, R., Rose, S., Melnyk, S., Jill James, S., Sequeira, J. M., and Quadros, E. V. (2018) Folinic acid improves verbal communication in children with autism and language impairment: a randomized double-blind placebo-controlled trial, *Mol. Psychiatry*, **23**, 247-256, doi: 10.1038/mp.2016.168.
 46. Rossignol, D. A., and Frye, R. E. (2021) Cerebral folate deficiency, folate receptor alpha autoantibodies and leucovorin (Folinic Acid) treatment in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis, *J. Pers. Med.*, **11**, 1141, doi: 10.3390/jpm11111141.
 47. Frye, R. E., Rossignol, D. A., Scahill, L., McDougle, C. J., Huberman, H., and Quadros, E. V. (2020) Treatment of folate metabolism abnormalities in autism spectrum disorder, *Semin. Pediatr. Neurol.*, **35**, 100835, doi: 10.1016/j.spen.2020.100835.
 48. Rossignol, D. A., and Frye, R. E. (2012) Substantial problems with measuring brain mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder using magnetic resonance spectroscopy, *J. Autism Dev. Disord.*, **42**, 640-642, doi: 10.1007/s10803-011-1276-z.
 49. Desai, A., Sequeira, J. M., and Quadros, E. V. (2016) The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport, *Biochimie*, **126**, 31-42, doi: 10.1016/j.biochi.2016.02.012.
 50. Shoffner, J., Trommer, B., Thurm, A., Farmer, C., Langley, W. A., Soskey, L., Rodriguez, A. N., D'Souza, P., Spence, S. J., Hyland, K., and Swedo, S. E. (2016) CSF concentrations of 5-methyltetrahydrofolate in a cohort of young children with autism, *Neurology*, **86**, 2258-2263, doi: 10.1212/WNL.0000000000002766.
 51. Bent, S., Chen, Y., McDonald, M. G., Widjaja, F., Wahlberg, J., and Hendren, R. L. (2020) An examination of changes in urinary metabolites and behaviors with the use of leucovorin calcium in children with autism spectrum disorder (ASD), *Adv. Neurodev. Disord.*, **4**, 241-246, doi: 10.1007/s41252-020-00157-8.
 52. Watanabe, T., Abe, O., Kuwabara, H., Yahata, N., Takano, Y., Iwashiro, N., Natsumori, T., Aoki, Y., Takao, H., Kawakubo, Y., Kamio, Y., Kato, N., Miyashita, Y., Kasai, K., and Yamasue, H. (2014) Mitigation of sociocommunicational deficits of autism through oxytocin-induced recovery of medial prefrontal activity, *JAMA Psychiatry*, **71**, 166, doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.3181.
 53. King, L. B., Walum, H., Inoue, K., Eyrich, N. W., and Young, L. J. (2016) Variation in the oxytocin receptor gene predicts brain region-specific expression and social attachment, *Biol. Psychiatry*, **80**, 160-169, doi: 10.1016/j.biopsych.2015.12.008.
 54. Green, L., Fein, D., Modahl, C., Feinstein, C., Waterhouse, L., and Morris, M. (2001) Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms, *Biol. Psychiatry*, **50**, 609-613, doi: 10.1016/S0006-3223(01)01139-8.
 55. Wu, S., Jia, M., Ruan, Y., Liu, J., Guo, Y., Shuang, M., Gong, X., Zhang, Y., Yang, X., and Zhang, D. (2005) Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population, *Biol. Psychiatry*, **58**, 74-77, doi: 10.1016/j.biopsych.2005.03.013.
 56. Jacob, S., Brune, C. W., Carter, C. S., Leventhal, B. L., Lord, C., and Cook, E. H. (2007) Association of the oxytocin receptor gene (OXTR) in Caucasian children and adolescents with autism, *Neurosci. Lett.*, **417**, 6-9, doi: 10.1016/j.neulet.2007.02.001.
 57. Yrigollen, C. M., Han, S. S., Kochetkova, A., Babitz, T., Chang, J. T., Volkmar, F. R., Leckman, J. F., and Grigorenko, E. L. (2008) Genes controlling affiliative behavior as candidate genes for autism, *Biol. Psychiatry*, **63**, 911-916, doi: 10.1016/j.biopsych.2007.11.015.
 58. Andari, E., Duhamel, J.-R., Zalla, T., Herbrecht, E., Leboyer, M., and Sirigu, A. (2010) Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4389-4394, doi: 10.1073/pnas.0910249107.
 59. Liu, X., Kawamura, Y., Shimada, T., Otowa, T., Koishi, S., Sugiyama, T., Nishida, H., Hashimoto, O., Nakagami, R., Tochigi, M., Umekage, T., Kano, Y., Miyagawa, T., Kato, N., Tokunaga, K., and Sasaki, T. (2010) Association of the oxytocin receptor (OXTR) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD) in the Japanese population, *J. Hum. Genet.*, **55**, 137-141, doi: 10.1038/jhg.2009.140.
 60. Tansey, K. E., Brookes, K. J., Hill, M. J., Cochran, L. E., Gill, M., Skuse, D., Correia, C., Vicente, A., Kent, L., Gallagher, L., and Anney, R. J. L. (2010) Oxytocin receptor (OXTR) does not play a major role in the aetiology of autism: Genetic and molecular studies, *Neurosci. Lett.*, **474**, 163-167, doi: 10.1016/j.neulet.2010.03.035.
 61. Wermter, A.-K., Kamp-Becker, I., Hesse, P., Schulte-Körne, G., Strauch, K., and Remschmidt, H. (2010) Evidence for the involvement of genetic variation in the oxytocin receptor gene (OXTR) in the etiology of autistic disorders on high-functioning level, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **153B**, 629-639, doi: 10.1002/ajmg.b.31032.
 62. Campbell, D. B., Datta, D., Jones, S. T., Batey Lee, E., Sutcliffe, J. S., Hammock, E. A., and Levitt, P. (2011)

- Association of oxytocin receptor (OXTR) gene variants with multiple phenotype domains of autism spectrum disorder, *J. Neurodev. Disord.*, **3**, 101-112, doi: 10.1007/s11689-010-9071-2.
63. Al-Ali, Z., Yasseen, A. A., Al-Dujaili, A., Al-Karagully, A. J., McAllister, K. A., and Jumaah, A. S. (2022) The oxytocin receptor gene polymorphism rs2268491 and serum oxytocin alterations are indicative of autism spectrum disorder: A case-control paediatric study in Iraq with personalized medicine implications, *PLoS One*, **17**, e0265217, doi: 10.1371/journal.pone.0265217.
64. Gregory, S. G., Connelly, J. J., Towers, A. J., Johnson, J., Biscocho, D., Markunas, C. A., Lintas, C., Abramson, R. K., Wright, H. H., Ellis, P., Langford, C. F., Worley, G., Delong, G. R., Murphy, S. K., Cuccaro, M. L., Persico, A., and Pericak-Vance, M. A. (2009) Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism, *BMC Med.*, **7**, 62, doi: 10.1186/1741-7015-7-62.
65. Grieb, Z. A., and Lonstein, J. S. (2022) Oxytocin interactions with central dopamine and serotonin systems regulate different components of motherhood, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **377**, 20210062, doi: 10.1098/rstb.2021.0062.
66. Borie, A. M., Young, L. J., and Liu, R. C. (2022) Sex-specific and social experience-dependent oxytocin-endocannabinoid interactions in the nucleus accumbens: implications for social behavior, *Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci.*, **377**, 20210057, doi: 10.1098/rstb.2021.0057.
67. Putnam, P. T., and Chang, S. W. C. (2022) Interplay between the oxytocin and opioid systems in regulating social behavior, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **377**, 20210050, doi: 10.1098/rstb.2021.0050.
68. Moerkerke, M., Peeters, M., de Vries, L., Daniels, N., Steyaert, J., Alaerts, K., and Boets, B. (2021) Endogenous oxytocin levels in autism a meta-analysis, *Brain Sci.*, **11**, 1545, doi: 10.3390/brainsci11111545.
69. Rokicki, J., Kaufmann, T., de Lange, A. G., van der Meer, D., Bahrami, S., Sartorius, A. M., Haukvik, U. K., Steen, N. E., Schwarz, E., Stein, D. J., Nærland, T., Andreassen, O. A., Westlye, L. T., and Quintana, D. S. (2022) Oxytocin receptor expression patterns in the human brain across development, *Neuropsychopharmacology*, **47**, 1550-1560, doi: 10.1038/s41386-022-01305-5.
70. Parker, K. J., Oztan, O., Libove, R. A., Mohsin, N., Karhson, D. S., Sumiyoshi, R. D., Summers, J. E., Hinman, K. E., Motonaga, K. S., Phillips, J. M., Carson, D. S., Fung, L. K., Garner, J. P., and Hardan, A. Y. (2019) A randomized placebo-controlled pilot trial shows that intranasal vasopressin improves social deficits in children with autism, *Sci. Transl. Med.*, **11**, eaau7356, doi: 10.1126/scitranslmed.aau7356.
71. Alaerts, K., Steyaert, J., Vanaudenaerde, B., Wenderoth, N., and Bernaerts, S. (2021) Changes in endogenous oxytocin levels after intranasal oxytocin treatment in adult men with autism: An exploratory study with long-term follow-up, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **43**, 147-152, doi: 10.1016/j.euroneuro.2020.11.014.
72. Winterton, A., Westlye, L. T., Steen, N. E., Andreassen, O. A., and Quintana, D. S. (2021) Improving the precision of intranasal oxytocin research, *Nat Hum Behav.*, **5**, 9-18, doi: 10.1038/s41562-020-00996-4.
73. Spanos, M., Chandrasekhar, T., Kim, S.-J., Hamer, R. M., King, B. H., McDougale, C. J., Sanders, K. B., Gregory, S. G., Kolevzon, A., Veenstra-VanderWeele, J., and Sikich, L. (2020) Rationale, design, and methods of the Autism Centers of Excellence (ACE) network study of oxytocin in autism to improve reciprocal social behaviors (SOARS-B), *Contemp. Clin. Trials*, **98**, 106103, doi: 10.1016/j.cct.2020.106103.
74. Erdman, S. E., and Poutahidis, T. (2016) Microbes and oxytocin: benefits for host physiology and behavior, *Int. Rev. Neurobiol.*, **131**, 91-126, doi: 10.1016/bs.irn.2016.07.004.
75. Sgritta, M., Dooling, S. W., Buffington, S. A., Momin, E. N., Francis, M. B., Britton, R. A., and Costa-Mattioli, M. (2019) Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder, *Neuron*, **101**, 246-259, doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.018.
76. Huang, M., Liu, K., Wei, Z., Feng, Z., Chen, J., Yang, J., Zhong, Q., Wan, G., and Kong, X. J. (2021) Serum oxytocin level correlates with gut microbiome dysbiosis in children with autism spectrum disorder, *Front. Neurosci.*, **15**, 721884, doi: 10.3389/fnins.2021.721884.
77. Oztan, O., Garner, J. P., Partap, S., Sherr, E. H., Hardan, A. Y., Farmer, C., Thurm, A., Swedo, S. E., and Parker, K. J. (2018) Cerebrospinal fluid vasopressin and symptom severity in children with autism, *Ann. Neurol.*, **84**, 611-615, doi: 10.1002/ana.25314.
78. Carson, D. S., Garner, J. P., Hyde, S. A., Libove, R. A., Berquist, S. W., Hornbeak, K. B., Jackson, L. P., Sumiyoshi, R. D., Howerton, C. L., Hannah, S. L., Partap, S., Phillips, J. M., Hardan, A. Y., and Parker, K. J. (2015) Arginine vasopressin is a blood-based biomarker of social functioning in children with autism, *PLoS One*, **10**, e0132224, doi: 10.1371/journal.pone.0132224.
79. Parker, K. J. (2022) Leveraging a translational research approach to drive diagnostic and treatment advances for autism, *Mol. Psychiatry*, **27**, 2650-2658, doi: 10.1038/s41380-022-01532-8.
80. Port, R. G., Oberman, L. M., and Roberts, T. P. (2019) Revisiting the excitation/inhibition imbalance hypothesis of ASD through a clinical lens, *Br. J. Radiol.*, **92**, 20180944, doi: 10.1259/bjr.20180944.
81. Hassan, T. H., Abdelrahman, H. M., Abdel Fattah, N. R., El-Masry, N. M., Hashim, H. M., El-Gerby, K. M.,

- and Abdel Fattah, N. R. (2013) Blood and brain glutamate levels in children with autistic disorder, *Res. Autism Spectr. Disord.*, **7**, 541-548, doi: 10.1016/j.rasd.2012.12.005.
82. Zhang, L., Huang, C. C., Dai, Y., Luo, Q., Ji, Y., Wang, K., Deng, S., Yu, J., Xu, M., Du, X., Tang, Y., Shen, C., Feng, J., Sahakian, B. J., Lin, C. P., and Li, F. (2020) Symptom improvement in children with autism spectrum disorder following bumetanide administration is associated with decreased GABA/glutamate ratios, *Transl. Psychiatry*, **10**, 9, doi: 10.1038/s41398-020-0692-2.
 83. McCracken, J. T. (2018) Target engagement of AZD7325 in Adults with ASD, *J. Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **57**, S287, doi: 10.1016/j.jaac.2018.07.683.
 84. Ajram, L. A., Horder, J., Mendez, M. A., Galanopoulos, A., Brennan, L. P., Wichers, R. H., Robertson, D. M., Murphy, C. M., Zinkstok, J., Ivin, G., Heasman, M., Meek, D., Tricklebank, M. D., Barker, G. J., Lythgoe, D. J., Edden, R. A. E., Williams, S. C., Murphy, D. G. M., and McAloon, G. M. (2017) Shifting brain inhibitory balance and connectivity of the prefrontal cortex of adults with autism spectrum disorder, *Transl. Psychiatry*, **7**, e1137, doi: 10.1038/tp.2017.104.
 85. Grabb, M. C., Cross, A. J., Potter, W. Z., and McCracken, J. T. (2016) Derisking psychiatric drug development: The NIMH's fast fail program, a novel precompetitive model, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **36**, 419-421, doi: 10.1097/JCP.0000000000000536.
 86. De Stefano, L. A., Schmitt, L. M., White, S. P., Mosconi, M. W., Sweeney, J. A., and Ethridge, L. E. (2019) Developmental effects on auditory neural oscillatory synchronization abnormalities in autism spectrum disorder, *Front. Integr. Neurosci.*, **13**, 34, doi: 10.3389/fnint.2019.00034.
 87. Bromander, S., Anckarsäter, R., Kristiansson, M., Blennow, K., Zetterberg, H., Anckarsäter, H., and Wass, C. E. (2012) Changes in serum and cerebrospinal fluid cytokines in response to non-neurological surgery: an observational study, *J. Neuroinflammation*, **9**, 758, doi: 10.1186/1742-2094-9-242.
 88. Pardo, C. A., Farmer, C. A., Thurm, A., Shebl, F. M., Ilieva, J., Kalra, S., and Swedo, S. (2017) Serum and cerebrospinal fluid immune mediators in children with autistic disorder: a longitudinal study, *Mol. Autism*, **8**, 1, doi: 10.1186/s13229-016-0115-7.
 89. Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., and Pardo, C. A. (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism, *Ann. Neurol.*, **57**, 67-81, doi: 10.1002/ana.20315.
 90. Estes, M. L., and McAllister, A. K. (2015) Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder, *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 469-486, doi: 10.1038/nrn3978.
 91. Li, Q., Zhang, L., Shan, H., Yu, J., Dai, Y., He, H., Li, W. G., Langley, C., Sahakian, B. J., Yao, Y., Luo, Q., and Li, F. (2022) The immuno-behavioural covariation associated with the treatment response to bumetanide in young children with autism spectrum disorder, *Transl. Psychiatry*, **12**, 228, doi: 10.1038/s41398-022-01987-x.
 92. Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X. M., Ji, L., Brown, T., and Malik, M. (2009) Elevated immune response in the brain of autistic patients, *J. Neuroimmunol.*, **207**, 111-116, doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.12.002.
 93. Saghazadeh, A., Ataenia, B., Keynejad, K., Abdolalizadeh, A., Hirbod-Mobarakeh, A., and Rezaei, N. (2019) A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: effects of age, gender, and latitude, *J. Psychiatr. Res.*, **115**, 90-102, doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.05.019.
 94. Molloy, C. A., Morrow, A. L., Meinzen-Derr, J., Schleifer, K., Dienger, K., Manning-Courtney, P., Altaye, M., and Wills-Karp, M. (2006) Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder, *J. Neuroimmunol.*, **172**, 198-205, doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.11.007.
 95. Resta-Lenert, S., and Barrett, K. E. (2006) Probiotics and commensals reverse TNF- α - and IFN- γ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells, *Gastroenterology*, **130**, 731-746, doi: 10.1053/j.gastro.2005.12.015.
 96. Bertelsen, L. S., Eckmann, L., and Barrett, K. E. (2004) Prolonged interferon- γ exposure decreases ion transport, NKCC1, and Na⁺-K⁺-ATPase expression in human intestinal xenografts *in vivo*, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **286**, G157-G165, doi: 10.1152/ajpgi.00227.2003.
 97. Sharp, T., and Barnes, N. M. (2020) Central 5-HT receptors and their function; present and future, *Neuropharmacology*, **177**, 108155, doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108155.
 98. Rose-Meyer, R. (2013) A review of the serotonin transporter and prenatal cortisol in the development of autism spectrum disorders, *Mol. Autism*, **4**, 37, doi: 10.1186/2040-2392-4-37.
 99. Andersson, M., Tangen, Å., Farde, L., Bölte, S., Halldin, C., Borg, J., and Lundberg, J. (2021) Serotonin transporter availability in adults with autism – a positron emission tomography study, *Mol. Psychiatry*, **26**, 1647-1658, doi: 10.1038/s41380-020-00868-3.
 100. Sutcliffe, J. S., Delahanty, R. J., Prasad, H. C., McCauley, J. L., Han, Q., Jiang, L., Li, C., Folstein, S. E., and Blakely, R. D. (2005) Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors, *Am. J. Hum. Genet.*, **77**, 265-279, doi: 10.1086/432648.
 101. Adamsen, D., Ramaekers, V., Ho, H. T., Britschgi, C., Rüfenacht, V., Meili, D., Bobrowski, E., Philippe, P.,

- Nava, C., Van Maldergem, L., Bruggmann, R., Walitza, S., Wang, J., Grünblatt, E., and Thöny, B. (2014) Autism spectrum disorder associated with low serotonin in CSF and mutations in the SLC29A4 plasma membrane monoamine transporter (PMAT) gene, *Mol. Autism*, **5**, 43, doi: 10.1186/2040-2392-5-43.
102. Murphy, D. G., Daly, E., Schmitz, N., Toal, F., Murphy, K., Curran, S., Erlandsson, K., Eersels, J., Kerwin, R., Ell, P., and Travis, M. (2006) Cortical serotonin 5-HT_{2A} receptor binding and social communication in adults with Asperger's syndrome: an *in vivo* SPECT study, *Am. J. Psychiatry*, **163**, 934-936, doi: 10.1176/ajp.2006.163.5.934.
103. Makkonen, I., Riikonen, R., Kokki, H., Airaksinen, M. M., and Kuikka, J. T. (2008) Serotonin and dopamine transporter binding in children with autism determined by SPECT, *Dev. Med. Child Neurol.*, **50**, 593-597, doi: 10.1111/j.1469-8749.2008.03027.x.
104. Goldberg, J., Anderson, G. M., Zwaigenbaum, L., Hall, G. B., Nahmias, C., Thompson, A., and Szatmari, P. (2009) Cortical serotonin type-2 receptor density in parents of children with autism spectrum disorders, *J. Autism Dev. Disord.*, **39**, 97-104, doi: 10.1007/s10803-008-0604-4.
105. Beversdorf, D. Q., Nordgren, R. E., Bonab, A. A., Fischman, A. J., Weise, S. B., Dougherty, D. D., Felopulos, G. J., Zhou, F. C., and Bauman, M. L. (2012) 5-HT₂ receptor distribution shown by [¹⁸F] setoperone PET in high-functioning autistic adults, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **24**, 191-197, doi: 10.1176/appi.neuropsych.11080202.
106. Nakamura, K., Sekine, Y., Ouchi, Y., Tsujii, M., Yoshikawa, E., Futatsubashi, M., Tsuchiya, K. J., Sugihara, G., Iwata, Y., Suzuki, K., Matsuzaki, H., Suda, S., Sugiyama, T., Takei, N., and Mori, N. (2010) Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism, *Arch. Gen. Psychiatry*, **67**, 59, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.137.
107. Chugani, D. C., Muzik, O., Behen, M., Rothermel, R., Janisse, J. J., Lee, J., and Chugani, H. T. (1999) Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children, *Ann. Neurol.*, **45**, 287-295, doi: 10.1002/1531-8249(199903)45:3<287::aid-ana3>3.0.co;2-9.
108. Chen, R., Davis, L. K., Guter, S., Wei, Q., Jacob, S., Potter, M. H., Cox, N. J., Cook, E. H., Sutcliffe, J. S., and Li, B. (2017) Leveraging blood serotonin as an endophenotype to identify *de novo* and rare variants involved in autism, *Mol. Autism*, **8**, 14, doi: 10.1186/s13229-017-0130-3.
109. Gabriele, S., Sacco, R., and Persico, A. M. (2014) Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **24**, 919-929, doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.02.004.
110. Wichers, R. H., Findon, J. L., Jelsma, A., Giampietro, V., Stoencheva, V., Robertson, D. M., Murphy, C. M., Blainey, S., McAlonan, G., Ecker, C., Rubia, K., Murphy, D. G. M., and Daly, E. M. (2021) Modulation of atypical brain activation during executive functioning in autism: a pharmacological MRI study of tianeptine, *Mol. Autism*, **12**, 14, doi: 10.1186/s13229-021-00422-0.
111. Israelyan, N., and Margolis, K. G. (2018) Serotonin as a link between the gut-brain-microbiome axis in autism spectrum disorders, *Pharmacol. Res.*, **132**, 1-6, doi: 10.1016/j.phrs.2018.03.020.
112. Mulder, E. J., Anderson, G. M., Kemperman, R. F. J., Oosterloo-Duinkerken, A., Minderaa, R. B., and Kema, I. P. (2010) Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid, serotonin and 6-sulphatoxymelatonin in normoserotonemic and hyper-serotonemic autistic individuals, *Neuropsychobiology*, **61**, 27-32, doi: 10.1159/000258640.
113. Zuniga-Kennedy, M., Davoren, M., Shuffrey, L. C., Luna, R. A., Savidge, T., Prasad, V., Anderson, G. M., Veenstra-VanderWeele, J., and Williams, K. C. (2022) Intestinal predictors of whole blood serotonin levels in children with or without autism, *J. Autism Dev. Disord.*, **52**, 3780-3789, doi: 10.1007/s10803-022-05597-w.
114. Robson, M. J., Quinlan, M. A., Margolis, K. G., Gajewski-Kurczel, P. A., Veenstra-VanderWeele, J., Gershon, M. D., Watterson, D. M., and Blakeley, R. D. (2018) p38 α MAPK signaling drives pharmacologically reversible brain and gastrointestinal phenotypes in the SERT Ala56 mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E10245-E10254, doi: 10.1073/pnas.1809137115.
115. Daly, E., Ecker, C., Hallahan, B., Deeley, Q., Craig, M., Murphy, C., Johnston, P., Spain, D., Gillan, N., Gudbrandsen, M., Brammer, M., Giampietro, V., Lamar, M., Page, L., Toal, F., Schmitz, N., Cleare, A., Robertson, D., Rubia, K., and Murphy, D. G. (2014) Response inhibition and serotonin in autism: a functional MRI study using acute tryptophan depletion, *Brain*, **137**, 2600-2610, doi: 10.1093/brain/awu178.
116. Boccuto, L., Chen, C. F., Pittman, A. R., Skinner, C. D., McCartney, H. J., Jones, K., Bochner, B. R., Stevenson, R. E., and Schwartz, C. E. (2013) Decreased tryptophan metabolism in patients with autism spectrum disorders, *Mol. Autism*, **4**, 16, doi: 10.1186/2040-2392-4-16.
117. Migliarini, S., Pacini, G., Pelosi, B., Lunardi, G., and Pasqualetti, M. (2013) Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation, *Mol. Psychiatry*, **18**, 1106-1118, doi: 10.1038/mp.2012.128.
118. Agus, A., Planchais, J., and Sokol, H. (2018) Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease, *Cell Host Microbe*, **23**, 716-724, doi: 10.1016/j.chom.2018.05.003.

119. Tang, W., Zhu, H., Feng, Y., Guo, R., and Wan, D. (2020) The impact of gut microbiota disorders on the blood-brain barrier, *Infect. Drug Resist.*, **13**, 3351-3363, doi: 10.2147/IDR.S254403.
120. Luo, Y., Eran, A., Palmer, N., Avillach, P., Levy-Moonshine, A., Szolovits, P., and Kohane, I. S. (2020) A multidimensional precision medicine approach identifies an autism subtype characterized by dyslipidemia, *Nat. Med.*, **26**, 1375-1379, doi: 10.1038/s41591-020-1007-0.
121. Sikora, D. M., Pettit-Kekel, K., Penfield, J., Merckens, L. S., and Steiner, R. D. (2006) The near universal presence of autism spectrum disorders in children with Smith–Lemli–Opitz syndrome, *Am. J. Med. Genet. A*, **140**, 1511-1518, doi: 10.1002/ajmg.a.31294.
122. Gong, H., Dong, W., Rostad, S. W., Marcovina, S. M., Albers, J. J., Brunzell, J. D., and Vuletic, S. (2013) Lipoprotein lipase (LPL) is associated with neurite pathology and its levels are markedly reduced in the dentate gyrus of Alzheimer's disease brains, *J. Histochem. Cytochem.*, **61**, 857-868, doi: 10.1369/0022155413505601.
123. Beffert, U., Stolt, P. C., and Herz, J. (2004) Functions of lipoprotein receptors in neurons, *J. Lipid Res.*, **45**, 403-409, doi: 10.1194/jlr.R300017-JLR200.
124. Kysenius, K., Muggalla, P., Mätlik, K., Arumäe, U., and Huttunen, H. J. (2012) PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling, *Cell. Mol. Life Sci.*, **69**, 1903-1916, doi: 10.1007/s00018-012-0977-6.
125. Buchovecky, C. M., Turley, S. D., Brown, H. M., Kyle, S. M., McDonald, J. G., Liu, B., Pieper, A. A., Huang, W., Katz, D. M., Russell, D. W., Shendure, J., and Justice, M. J. (2013) A suppressor screen in Mecp2 mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome, *Nat. Genet.*, **45**, 1013-1020, doi: 10.1038/ng.2714.
126. Tierney, E., Remaley, A. T., Thurm, A., Jager, L. R., Wassif, C. A., Kratz, L. E., Bailey-Wilson, J. E., Bukelis, I., Sarphare, G., Jung, E. S., Brand, B., Noah, K. K., and Porter, F. D. (2021) Sterol and lipid analyses identifies hypolipidemia and apolipoprotein disorders in autism associated with adaptive functioning deficits, *Transl. Psychiatry*, **11**, 471, doi: 10.1038/s41398-021-01580-8.
127. Frye, R. E. (2020) Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder: unique abnormalities and targeted treatments, *Semin. Pediatr. Neurol.*, **35**, 100829, doi: 10.1016/j.spen.2020.100829.
128. Oliveira, G., Ataíde, A., Marques, C., Miguel, T. S., Coutinho, A. M., Mota-Vieira, L., Gonçalves, E., Lopes, N. M., Rodrigues, V., Carmona da Mota, H., and Vicente, A. M. (2007) Epidemiology of autism spectrum disorder in Portugal: prevalence, clinical characterization, and medical conditions, *Dev. Med. Child Neurol.*, **49**, 726-733, doi: 10.1111/j.1469-8749.2007.00726.x.
129. Demarquoy, C., and Demarquoy, J. (2019) Autism and carnitine: A possible link, *World J. Biol. Chem.*, **10**, 7-16, doi: 10.4331/wjbc.v10.i1.7.
130. Fahmy, S. F., El-Hamamsy, M., Zaki, O., and Badary, O. A. (2013) Effect of L-carnitine on behavioral disorder in autistic children, *Value Health*, **16**, A15, doi: 10.1016/j.jval.2013.03.092.

DIFFERENTIATED APPROACH TO THE PHARMACOTHERAPY OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS: BIOCHEMICAL ASPECTS

Review

I. S. Boksha*, T. A. Prokhorova, E. B. Tereshkina, O. K. Savushkina, and G. Sh. Burbaeva

Mental Health Research Center, 115522 Moscow, Russia; e-mail: boksha_irina@mail.ru

Autism Spectrum Disorders (ASD) are highly heterogeneous neurodevelopmental disorders caused by a complex interaction of numerous genetic and environmental factors and leading to deviations in the nervous system formation at very early developmental stages. Currently, there are no accepted pharmacological treatments for so-called core symptoms of ASD, such as social communication disorders and restricted and repetitive behavior patterns. The lack of knowledge about biological basis of ASD, the absence of clinically significant biochemical parameters reflecting abnormalities in signaling molecular cascades controlling the nervous system development and functioning, and the lack of methods for selection of clinically and biologically homogeneous subgroups are considered among the causes for the failure of clinical trials of ASD pharmacotherapy. This review considers the possibilities of applying a differentiated clinical and biological approach to the targeted search for ASD pharmacotherapy with an emphasis on biochemical markers associated with ASD and attempts to stratify patients by biochemical parameters. The use of approach such as “target-oriented therapy and assessment of the status of the target before and during the treatment to identify patients with a positive response to treatment” is discussed using the published results of clinical trials as examples. It is concluded that the identification of biochemical parameters for the identification of distinct

subgroups among ASD patients requires research on large samples reflecting the clinical and biological diversity of patients with ASD, and the use of unified approaches for such studies. An integrated approach, including clinical observation, clinical-psychological assessment of patient behavior, study of anamnesis and description of individual molecular profiles should become a new strategy for stratifying and subgrouping patients with ASD for clinical pharmacotherapeutic trials, as well as for evaluating its efficiency.

Keywords: autism spectrum disorders, pharmacotherapy, biomarkers, molecular targets

ПРОТЕАСОМНЫЙ ИНТЕРАКТОМ И ЕГО РОЛЬ В МЕХАНИЗМАХ ПЛАСТИЧНОСТИ МОЗГА

Обзор

© 2023 О.А. Бунеева, А.Т. Копылов, А.Е. Медведев*

НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: professor57@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 29.11.2022

Протеасомы — высококонсервативные мультиферментные комплексы, ответственные за расщепление короткоживущих, регуляторных, неправильно свернутых и поврежденных белков. Они играют важную роль в процессах пластичности мозга, и снижение их функциональной активности сопровождается развитием нейродегенеративной патологии. Исследования, выполненные в разных лабораториях как на культивируемых клетках млекопитающих и человека, так и на препаратах коры мозга крысы и мозга кролика, выявили большое количество белков, ассоциированных с протеасомами. Поскольку идентифицированные белки принадлежат к определенным метаболическим путям, многократное обогащение фракции протеасом этими белками свидетельствует о важной роли последних для функционирования протеасом. Если экстраполировать на мозг человека данные, полученные на различных биологических объектах, можно предположить, что ассоциированные с протеасомами белки составляют не менее 28% протеома мозга человека. Протеасомный интерактом мозга содержит большое количество белков, принимающих участие в сборке этих надмолекулярных комплексов, регуляции функционирования и внутриклеточной локализации, которая может меняться при изменении условий (например, при окислительном стрессе) или в различные фазы клеточного цикла. В контексте молекулярных функций Gene Ontology (GO) Pathways белки протеасомного интерактома обеспечивают взаимодействие компонентов более 30 метаболических путей, аннотированных в терминах GO. Главным итогом этих взаимодействий, по-видимому, является связывание адениновых и гуаниновых нуклеотидов, которые, очевидно, обеспечивают реализацию нуклеотид-зависимых функций 26S- и 20S-протеасом. Поскольку развитие нейродегенеративной патологии чаще всего связано с региоселективным снижением функциональной активности протеасом, положительный терапевтический эффект, очевидно, будут оказывать факторы, способствующие повышению активности протеасом. В любом случае фармакологическая регуляция протеасом мозга, по-видимому, реализуется через изменение состава и/или активности белков, ассоциированных с ними (деубиквитиназы, PKA, CaMKIIα и др.).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеасомы, мозг, 20S-субчастица, 19S-субчастица, субклеточная локализация и функции, ассоциированные с протеасомами белки, протеасомный протеом и интерактом.

DOI: 10.31857/S032097252303003X, EDN: QWFWPM

ВВЕДЕНИЕ

Протеасомы — высококонсервативные мультиферментные комплексы, присутствующие во всех прокариотических и эукариотических клетках и осуществляющие расщепление короткоживущих, регуляторных, неправильно свернутых и поврежденных белков [1–3].

Протеолитическая коровая (сердцевинная) и регуляторная субчастицы протеасом, а также протеасома, содержащая обе субчастицы, получили названия 20S-, 19S- и 26S-протеасом в соответствии с их коэффициентами седиментации. Протеасомы играют важную роль в процессах пластичности мозга, и снижение

Принятые сокращения: УПС — убиквитин-протеасомная система; Escm29 — регулятор окислительного стресса; PA28 — 11S-субчастица; PKA — cAMP-зависимая протеинкиназа; Rpn — субъединицы, не обладающие АТФазной активностью; Rpt — субъединицы, обладающие АТФазной активностью.

* Адресат для корреспонденции.

их функциональной активности сопровождается развитием нейродегенеративной патологии [2, 3].

В большинстве случаев подлежащие протеасомной деградации белки сначала подвергаются убиквитинированию — АТР-зависимому присоединению остатков убиквитина, белка с молекулярной массой около 8,5 кДа. Меченные таким образом полиубиквитинированные белки узнаются рецепторами 19S-субчастицы протеасомы. В ней под действием деубиквитиназ происходит отщепление убиквитиновой метки, а подлежащие протеолитической деградации белки поступают в 20S-протеасому [4, 5]. Помимо такого пути доставки белков для деградации в протеасомах, известного как АТР- и убиквитин-зависимый [6], белки могут подвергаться деградации в протеасомах АТР- и убиквитин-независимым путем [7–11]. В последнем случае одной из основных структурных предпосылок такой деградации белков является наличие неструктурированных областей, которые и обеспечивают взаимодействие с 20S-протеасомой [12].

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ПРОТЕАСОМ

20S-протеасома (20S-субчастица). 20S-протеасома представляет собой цилиндр, состоящий из четырех гептамерных колец, каждое из которых образовано семью α - или семью β -субъединицами, кодируемыми четырнадцатью различными генами. Два внешних кольца цилиндра, состоящие из субъединиц α -типа, во-первых, выполняют функцию «ворот», через которые белки-субстраты попадают во внутреннюю каталитическую область, и, во-вторых, отвечают за ассоциацию 20S-протеасомы с регуляторными субчастицами [13]. Два внутренних кольца образованы β -субъединицами, из которых субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ обладают соответственно каспазоподобной, трипсиноподобной и химотрипсиноподобной активностями [14, 15] (рис. 1).

19S-протеасома (19S-субчастица) и другие регуляторы протеасом. 19S-субчастица. Регуляторная 19S-субчастица, известная также как активатор протеасомы 700 (PA700; Proteasome activator 700), состоит из двух субкомплексов: «крышки» (lid) и «основания» (base) и включает в себя до 20 различных субъединиц, обладающих или не обладающих АТРазной активностью (рис. 1). Субъединицы, обладающие АТРазной активностью, обозначаются как Rpt-субъединицы (Rpt — regulatory particle triphosphatase), а субъединицы, не обладаю-

щие АТРазной активностью, — Rpn (Rpn — regulatory particle non-triphosphatase). Помимо 19S-субчастиц (PA700), которые могут присоединяться к коровой части протеасомы с одной стороны или с двух сторон сразу, есть и другие регуляторы протеасомы. PA28 (или 11S-субчастица) существует в двух основных формах: PA28 $\alpha\beta$ и PA28 γ (или REG γ). PA28 $\alpha\beta$ экспрессируется в цитоплазме, состоит из двух субъединиц α и β массой по 28 кДа, индуцируется γ -интерфероном и усиливает способность 20S-протеасомы расщеплять короткие пептиды и окисленные субстраты [15, 16]. Активатор протеасомы PA28 γ экспрессируется в ядре; присоединяясь к коровой части протеасомы, действует, подобно молекулярному сити, отбирая белки для деградации непосредственно в коровой части протеасомы по АТР- и убиквитин-независимому пути. PA28 γ принимает участие в регуляции таких важных клеточных процессов, как клеточный рост и пролиферация, апоптоз, репарация ДНК, иммунный ответ, метаболизм, таким образом, поддерживая гомеостаз клетки [17].

19S-регуляторная субчастица ответственна за распознавание полиубиквитинированных субстратов, их разворачивание, деубиквитинирование и направление во внутреннее пространство коровой части, где они расщепляются до олигопептидов. Активный транспорт субстратов в каталитическую область осуществляется с использованием энергии гидролиза АТР. Шесть субъединиц «основания» 19S-регуляторной субчастицы (Rpt1–Rpt6) относятся к АТРазам семейства AAA (ATPases associated with various cellular activities). Эти субъединицы образуют кольцо, как и четыре субъединицы, не обладающие АТРазной активностью (Rpn1, Rpn2, Rpn10 и Rpn13) [18]. Субъединицы Rpn1, Rpn10 и Rpn13 служат рецепторами убиквитина, распознавая субстраты, меченные для элиминации в протеасоме [19–22]. Субъединицы — убиквитиновые рецепторы — различаются по своему сродству к разным полиубиквитиновым цепям [23, 24]. «Крышка» представлена девятью различными субъединицами (Rpn3, Rpn5–9, Rpn11, Rpn12 и Rpn15), которые формируют подковообразную структуру [25–27]. Основная функция «крышки» — деубиквитинирование субстратов, осуществляемое при помощи нескольких деубиквитиназ (одна из них — собственный компонент протеасомы Rpn11) [28–30]. Энергия АТР необходима для стабилизации комплекса регуляторной и каталитической субчастиц протеасомы и главное — для изменений конформации субъединиц, позволяющих открыть «ворота» протеолитической полости

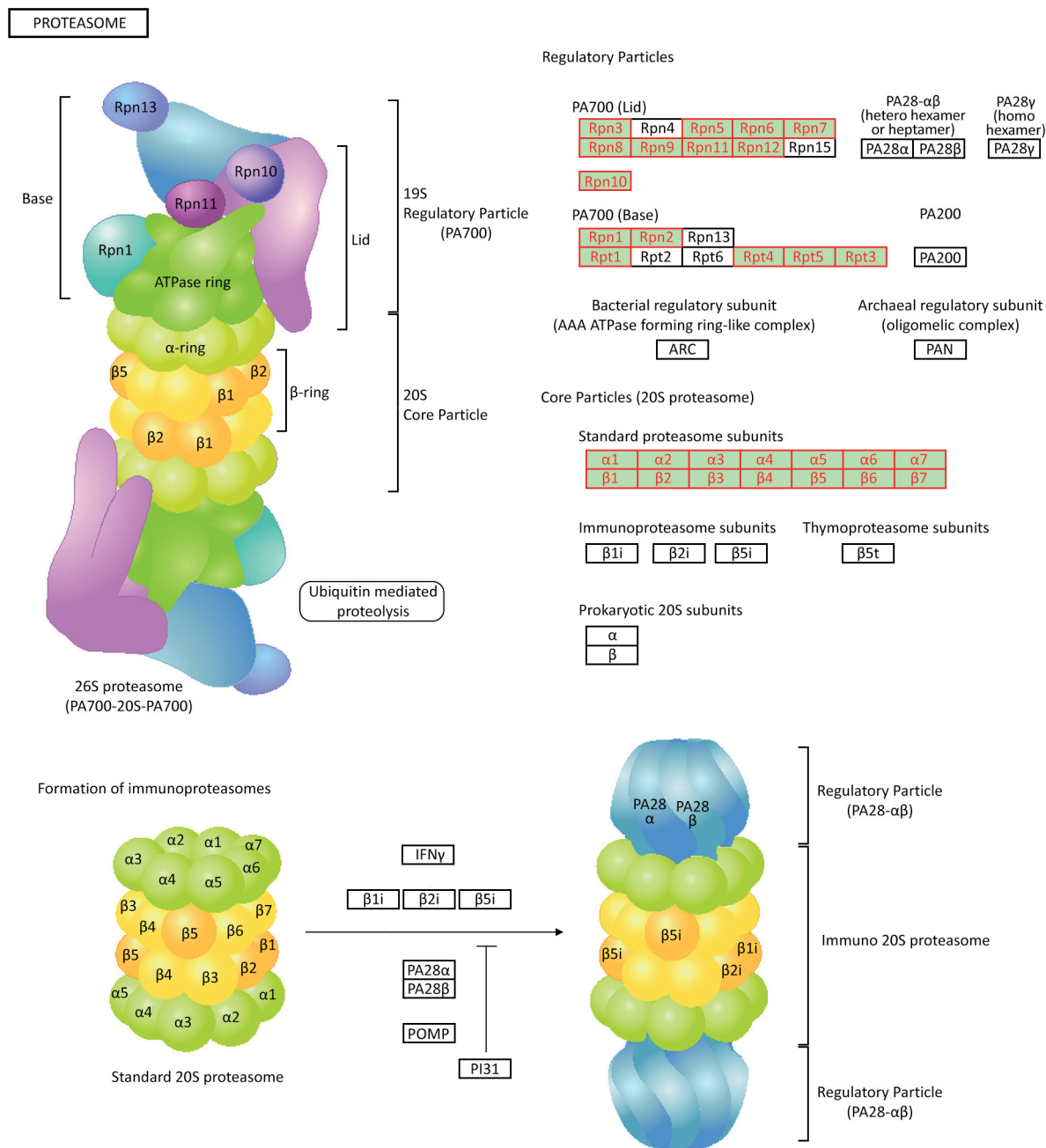


Рис. 1. Строение протеасом (см. пояснения в тексте). Изображение (map03050) адаптировано и взято из открытого ресурса KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa Laboratory) [15] с разрешения правообладателя

для прохождения внутрь белковых субстратов [31]. Энергия гидролиза АТФ используется также и для разворачивания субстратов во время перемещения их в протеолитическую область [32, 33].

Другие регуляторы протеасомы. Активатор протеасомы PA200 — фосфопротеин, широко представленный в клетке в виде пула, свободного от протеасом. В случае стрессовых условий PA200 рекрутируется протеасомами. При присоединении к 20S-протеасоме — усиливает ее пептидазную активность; способен также взаи-

модействовать с 26S-протеасомой, образуя 19S—20S—PA200 гибридную протеасому. PA200 участвует в ключевых сигнальных путях клетки, играет роль в репарации ДНК, обеспечивая стабильность генома. Экспрессия этого фактора резко увеличивается в случае опухолевых процессов и, наоборот, подавляется при нейродегенеративных заболеваниях. В настоящее время этому фактору уделяется пристальное внимание как возможной терапевтической мишени [34].

У высших позвоночных стимуляция клетки γ -интерфероном или другими противо-

воспалительными цитокинами приводит к тому, что при формировании протеасомы из 15S-препротеасомного комплекса образуется иммунопротеасома, содержащая вместо субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ альтернативные каталитические субъединицы $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ и обладающая видоизмененной протеолитической активностью и субстратной специфичностью [35, 36] (рис. 1). В настоящее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о роли иммунопротеасом не только в случае иммунного ответа, но и при окислительном стрессе, канцерогенезе и нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, аутоиммунные заболевания (в частности, рассеянный склероз) [37, 38].

Регулятор Escm29 играет ключевую роль в защите клетки от окислительного стресса. Было показано, что при окислительном стрессе происходит резкое увеличение количества 20S-протеасом в клетке не только в результате регуляции транскрипции, но и благодаря диссоциации 26S-протеасомных комплексов. Это необходимо для скорейшей элиминации поврежденных белков убиквитин- и АТР-независимыми способами. Регулятор Escm29 ускоряет процесс диссоциации 26S-протеасом в ответ на окислительный стресс, по-видимому, вызывая конформационные изменения и влияя на белок-белковые взаимодействия между 19S- и 20S-субкомплексами [39].

Протеасомный регулятор PI31 (Proteasomal Inhibitor of 31 kDa) был первоначально открыт как ингибитор гидролиза пептидов 20S-протеасомой *in vitro*. Позже оказалось, что *in vivo* он, напротив, способствует протеасомному расщеплению белков. Рибозилирование PI31 способствует сборке 26S-протеасомы. Не так давно обнаружили, что этот фактор также работает как адаптер протеасомного транспорта в нейроны. В опытах на мутантных мышках было показано, что «выключение» этого фактора в спинальных мотонейронах и в клетках Пуркинье вызывает аксонопатию, дегенерацию нейронов, спинальную и мозжечковую неврологические дисфункции. Авторы предполагают, что протеасомный регулятор PI31 может играть ключевую роль в гомеостазе белков и функции синапсов и, соответственно, его дисфункции могут приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний у человека [40].

Сборка протеасом. Сборка протеасом представляет собой сложный регулируемый процесс; в настоящее время она достаточно хорошо изучена (на примере протеасом дрожжей и человека) благодаря криоэлектронной

микроскопии. Сборка коровой части у эукариот может быть условно разделена на три этапа: формирование α -кольца, формирование β -кольца, димеризация полупротеасомы и созревание. Эти этапы обеспечиваются пятью шаперонами, которые носят названия Pba1–Pba4 (proteasome biogenesis associated 1–4) и Ump1 (underpinning maturation of proteasome 1) у дрожжей и соответственно PAC1–PAC4 (proteasome assembly chaperone 1–4) и POMP (proteasome maturation protein) – в случае протеасом человека [41, 42].

Сборка регуляторной субчастицы – также многостадийный процесс; два ее субкомплекса – «крышка» и «основание» – могут собираться независимо друг от друга. В сборке «основания» участвуют пять шаперонов (соответственно у дрожжей и у человека): Nas2 (p27), Nas6 (p28), Hsm3 (S5b), Rpn14 (PAAF1) (proteasomal ATPase associated factor 1) и Adc17 (ATPase dedicated chaperone of 17 kDa). Было предложено две модели сборки «основания» регуляторной субчастицы протеасомы. Согласно одной из них, сборка «основания» не зависит от коровой части; другая модель предполагает, что 20S-субчастица служит «платформой» для формирования «основания» 19S-субчастицы [41, 42].

«Крышка» может собираться в отсутствие «основания» 19S-субчастицы и коровой части протеасомы. На первом этапе образуются два интермедиата: один состоит из субъединиц Rpn5–6, Rpn8, Rpn9 и Rpn11, другой – из субъединиц Rpn3, Rpn7 и Rpn15. После ассоциации этих интермедиатов присоединяется последняя субъединица Rpn12, что является триггером для конформационных изменений, позволяющих «крышке» присоединиться к «основанию» 19S-субчастицы. В ассоциации коровой и регуляторной части протеасомы принимают участие шаперон Nas6 (p28) и субъединицы «крышки» Rpn5 и Rpn6 [41, 43].

На сборку протеасом может влиять функциональное состояние митохондрий [44]. Дефекты дыхательного комплекса I ухудшают сборку 26S-протеасомы, нарушения которой менее заметны в присутствии пирувата или аспартата [44].

Компартментализация протеасом. Чтобы элиминировать соответствующие белки в нужный момент в нужном месте, протеасомам необходимо быть динамичными не только в аспекте их структуры, но и в аспекте компартментализации. Поэтому субклеточная локализация протеасом может меняться при изменении условий (например, при окислительном стрессе) или в различные фазы клеточного цикла.

Протеасомы содержатся в цитоплазме, часть их ассоциирована с цитоскелетом и мембранами эндоплазматического ретикулума. В то же время большое количество протеасом находится в ядре. Более того, в опытах на эмбриональных фибробластах мыши было показано, что новосинтезированные протеасомы находятся именно в ядре, тогда как трехдневные протеасомы в основном обнаруживались в цитоплазме, что свидетельствует о поступлении новосинтезированных протеасом из ядра в цитоплазму [45]. Примечательно, что белки, реализующие ядерные функции (циклины, ингибиторы циклин-зависимых киназ, факторы транскрипции NF- κ B, I κ B, p53), были одними из первых идентифицированных физиологических протеасомных субстратов [46–48].

Недавно у млекопитающих (в трех различных клеточных линиях) был обнаружен белок AKIRIN2 — адаптер импорта в ядро зрелых коровых частиц. AKIRIN2 обеспечивает наличие у зрелой коровой частицы специальной последовательности, необходимой для транспорта в ядро, и способствует связыванию транспортного рецептора импорта 9. AKIRIN2 ингибирует коровую субчастицу и расщепляется при попадании ее в ядро [49]. Механизмы импорта протеасом в ядро у дрожжей и млекопитающих схожи тем, что 20S-субчастица проходит через ядерные поровые комплексы в ингибированном либо незрелом состоянии, вероятно, для того чтобы избежать деградации белков ядерных пор, богатых неупорядоченными последовательностями.

На клетках млекопитающих и дрожжей было показано, что различные стрессовые факторы (ингибирование протеасом, окислительный стресс и другие) вызывают аккумуляцию протеасом в ядерных или окооядерных локусах (так называемых специфических «безмембранных органеллах»). Как только стрессовые факторы перестают действовать, наблюдается «демонтаж» этих «органелл» [50–53].

Если аберрантные белки вовремя не элиминируются в ядре из-за протеасомных дисфункций, они могут аккумулироваться в PML-тельцах (ядерные тельца промиелоцитарной лейкемии), заполняя «protein quality compartments» в ответ на стресс [54]. Протеасомы рекрутируются в PML-тельца для деградации белков, однако в неблагоприятных условиях, например, при недостатке АТФ, убиквитин-протеасомная система не может работать в полную силу. В этом случае PML-тельца с избытком протеасом становятся токсичными; это может приводить к нейродегенеративным заболеваниям [55].

В нейронах обнаружен новый 20S-протеасомный комплекс, локализованный в плазматической мембране и экспонированный во внеклеточное пространство [56, 57]. Образующиеся в результате работы этого комплекса пептиды могут стимулировать кальциевую сигнализацию нейронов.

Посттрансляционные модификации протеасом. Среди посттрансляционных модификаций протеасом наиболее изучено фосфорилирование. Согласно базе данных PhosphoSitePlus, известно более 450 фосфосайтов на 26S-протеасоме человека, которые были обнаружены на каждой субъединице протеасом [58]. Окружающие фосфосайты протеасом аминокислотные последовательности соответствуют мотивам узнавания различных протеинкиназ (MAPK, CDK, CaMK, GSK3 и некоторых других) [58]. Это предполагает участие различных протеинкиназ в регуляции функции протеасом (и протеинфосфатаз, осуществляющих обратимость такой регуляции путем дефосфорилирования). Результаты нескольких исследований свидетельствуют в пользу того, что фосфорилирование Rpn6-субъединицы 19S-протеасом cAMP-зависимой протеинкиназой (РКА) повышает активность протеасом и увеличивает деградацию токсических белков. Активация РКА *in vivo* путем увеличения уровня внутриклеточного cAMP снижала накопление фосфорилированного тау-белка и улучшала когнитивные функции у мышей с таупатией [59]. Стимуляция активности 26S-протеасомы при фосфорилировании cGMP-зависимой протеинкиназой также способствовала увеличению протеасомной деградации белков (включая белки, вовлеченные в развитие нейродегенеративных заболеваний) [60].

Помимо фосфорилирования, есть сообщения об O-связанном N-ацетилглюкозаминировании [61], ADP-рибозилировании [62], ацетилировании и миристилировании [63, 64]. O-связанное N-ацетилглюкозаминирование приводит к торможению АТФазной активности 26S-комплекса и ингибирует протеолитическую активность протеасом. У млекопитающих этому типу модификации (как *in vitro*, так и *in vivo*) подвергается Rpt2-субъединица 19S-протеасом [61]. ADP-рибозилирование способствует активности 26S-протеасом как в клетках дрозофилы, так и в клетках человека. Танкираза — фермент ADP-рибозилтрансферазы, а также шапероны dp27 и dS5b, участвующие в сборке 19S-протеасомы, связываются с регулятором протеасомы PI31. ADP-рибозилирование последнего снижает его сродство к α -субъединицам протеасомы 20S. Это снижает

действие PI31 на коровую субчастицу (20S). Кроме того, модификация PI31 увеличивает связывание и секвестрацию dp27 и dS5b из регуляторных частиц 19S, способствуя тем самым сборке 26S. Протеомное профилирование 26S-протеасом сердца мыши выявило *N*-концевое ацетилирование пяти субъединиц 19S-протеасом (Rpn1, Rpn5, Rpn6, Rpt3 и Rpt6) и пяти субъединиц 20S-протеасом (α 2, α 5, α 7, β 3 и β 4), а также *N*-концевое миристилирование Rpt2-субъединицы 19S-протеасом [63]. Увеличение ацетилирования субъединиц коровой части (20S) повышало протеолитическую активность протеасом мыши и человека [65, 66]. У дрожжей миристилированная Rpt2-субъединица направляет протеасомы для осуществления контроля качества ядерных белков. Мутации, блокирующие эту модификацию, приводят к нарушению внутриклеточной локализации протеасом [64].

Окислительная модификация сульфгидрильных групп 20S-протеасомы (окисление остатков цистеина Cys-SH до цистеинсульфеновой кислоты Cys-SOH) приводит к последующему S-глутатионилированию (Cys-S-SG). Это сопровождается частичной потерей химо-трипсиноподобной активности [67]. В условиях *in vitro* глутаредоксин 2 проявлял де-глутатионлигазную активность, удаляя глутатион из глутатионилированных *in vivo* и *in vitro* 20S-протеасом. Аналогичным образом действовали и другие цитоплазматические редокс-белки тиоредоксин 1 и тиоредоксин 2 [67].

БЕЛКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРОТЕАСОМАМИ

Помимо собственно протеасомных белков, фракции протеасом, выделенные при помощи различных методов из разных источников (от дрожжей до клеток и тканей высших позвоночных и человека), содержат существенное количество ассоциированных с этими частицами белков [68–78].

В одной из первых работ, посвященных анализу белкового состава очищенных 19S-, 20S- и 26S-протеасом дрожжей, все идентифицированные белки были разделены на несколько классов (по терминологии авторов работы) [70].

(1) Субъединицы протеасом, а также компоненты убиквитин-протеасомной системы (УПС), взаимодействующие с ними. К числу последних относятся убиквитиназы, деубиквитиназы и т.д.

(2) Белки-шапероны, участвующие в ассоциации/диссоциации протеасом, в разделении плотно упакованных убиквитинированных субстратов в ходе подготовки к их протеолизу, а также во взаимодействии с развернутыми (или неправильно свернутыми) белками-мишенями для последующей протеолитической деградации.

(3) Разнообразные белки, участвующие в регуляции транскрипции и трансляции, а также в функционировании цитоскелета, метаболизме РНК, делении клеток, проведении сигналов и метаболизме.

(4) Белки рибосом и гликолитические ферменты. С учетом данных о том, что не менее трети всех новосинтезированных белков клеток млекопитающих подвергаются протеасомной деградации в течение нескольких минут после трансляции [79], ассоциация белоксинтезирующей машины и УПС имеет важное значение в немедленной ликвидации aberrантных белков. К тому же реакции субстратного фосфорилирования, в которых участвуют гликолитические ферменты, создают потенциальные возможности образования дополнительных количеств АТФ, оказывающих влияние на нуклеотид-чувствительное взаимодействие белков с протеасомами, а также на функционирование субъединиц регуляторной 19S-субчастицы, проявляющих АТФазную активность (Rpt1–6).

Условность такого деления белков, ассоциированных с протеасомами, очевидна, особенно когда речь заходит о трех последних классах. Многофункциональные белки, например гликолиза, помимо своих классических биохимических функций, едва ли не с равным успехом могут рассматриваться и как шапероны (например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД)), и как белки, предназначенные для деградации в протеасомах. То же самое относится к регуляторам и компонентам трансляционной машины (рибосомные белки). Участие белков этих групп в конкретных метаболических путях, включая протеасомную деградацию, определяется их структурными особенностями в данный конкретный момент времени. Например, уже упоминавшийся выше фермент гликолиза – ГАФД – может выполнять шаперонные функции, защищая новосинтезированный белок, высвобожденный с рибосом, от протеасомной деградации [80]. Однако при окислении остатка цистеина (Cys²⁴⁷) ГАФД теряет способность выполнять функцию шаперона [80], и шаперон Hsp70, связываясь с окисленной ГАФД, защищает клетку от агрегации этого белка [81].

Исследования, выполненные как на культивируемых клетках млекопитающих и человека [68, 70–75], так и на препаратах коры мозга крысы [69], мозга и печени кролика [76, 77], также выявили большое количество белков, ассоциированных с протеасомами (таблица). Белки, не являющиеся собственно компонентами УПС, относятся к различным функциональным группам, включающим: (I) компоненты цитоскелета и белки, вовлеченные в транспортировку внутриклеточных «грузов»; (II) защитные белки; (III) сигнальные белки и регуляторы активности ферментов; (IV) регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки клеток; (V) метаболические ферменты, в том числе мультифункциональные белки. Примечательно, что представленность ряда ассоциированных с протеасомами белков была не ниже и даже превышала представленность белков, формирующих структуру протеасом [69, 76, 77]. Уровень протеасомных субъединиц, формирующих коровую часть протеасомы, варьировал в диапазоне 400–1000 ед. (условные единицы, arbitrary units of spectrum counting); для субъединиц регуляторной субчастицы этот

показатель был в диапазоне 200–680 ед. [76]. Для ряда белков вышеприведенных функциональных групп представленность превышала обнаруженные для собственно протеасомных субъединиц диапазоны. Например: (I) цитоплазматический актин (P29751 Actin, cytoplasmic) – 1777,6 ед.; (II) белок теплового шока (G1T9M9 Heat shock protein family A (Hsp70) member 8) – 509,2 ед.; (III) кальмодулин (P62160 Calmodulin) – 1386,3 ед.; (IV) гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К (O19049 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) – 468,5 ед.; (V) ГАФД (P46406 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) – 952,8 ед. [76]. С учетом того, что абсолютное количество приведенных белков в мозге [82] отличается от их представленности во фракции протеасом, все это, очевидно, свидетельствует о том, что выделяемые вместе с фракцией протеасом белки не являются контаминантными, а представляют собой компоненты протеасомных протеомов. В пользу этого же свидетельствует и многократное обогащение выделенных протеасом мозга белками, принадлежащими к определенным метаболическим путям (рис. 2).



Рис. 2. Обогащение протеасом определенными группами белков, идентифицированных в мозге [76, 77]. Анализ данных ресурсом Quick GO по базе Explore Biology показал распределение обнаруженных белков по нескольким метаболическим путям. По отношению к полноразмерному протеому человека наибольшее обогащение обнаружено в случае белков, участвующих в метаболизме глутамина и глутамата (P02747; 100-кратное обогащение в субпротеоме связанных с протеасомами белков), гликолиза (P00024; 82-кратное обогащение), метаболизма фруктозы (P02744; 37-кратное обогащение), метаболизма пирувата (P02772; 34-кратное обогащение) и т.д. Заметное обогащение выявлено для метаболических путей, вовлеченных в развитие болезни Паркинсона (P00049; 12-кратное обогащение) и болезни Гентингтона (P00029; 8-кратное обогащение). Идентификаторы метаболических путей представлены в соответствии с номенклатурой ресурса Quick GO в терминах GO Slims (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>) [83]

Функциональные группы белков, ассоциированных с протеасомами

Источник протеасом	Метод выделения	Функциональные группы белков					Метод избирательной валидации взаимодействия с протеасомой	Ссылка
		I	II	III	IV	V		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	аффинная очистка на основе anti-Flag M2* агарозы	+	+	+	+	+	обратная коочистка и иммуноблоттинг	[70]
<i>S. cerevisiae</i>	изотопное мечение, сшивка <i>in vivo</i> и тандемная аффинная очистка SILAC**, количественный анализ QTAG***	+	+	+	+	+		[72]
<i>Homo sapiens</i> , клетки 293HF-UbR/Rpn11-TB	аффинная очистка с применением сшивки <i>in vivo</i> XBAP****		+	+	+	+		[74]
<i>H. sapiens</i> , клетки линия K562	аффинная очистка на основе комплекса биотин-стрептавидин с применением протеазы TEV *****	+	+	+		+	коочистка и иммуноблоттинг	[75]
<i>H. sapiens</i> , внеклеточные 26S-протеасомы клеточной линии K562	центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы и ионообменная хроматография	+			+			[73]
<i>H. sapiens</i> , 26S-протеасомы клеток hеs 293, экспрессирующих меченную Rpn11-НТВН	аффинная очистка MAP***** SILAC	+	+	+	+			[68]
<i>Rattus norvegicus</i> , цитозоль и синапсомы коры больших полушарий	аффинная очистка с использованием глутатион-сефарозы, GST (glutathione S-transferase) и мечения UBL (ubiquitin-like domain)	+	+	+	+		коочистка и иммуноблоттинг	[69]
<i>R. norvegicus</i> , скелетные мышцы	аффинная очистка с использованием глутатион-сефарозы, GST (glutathione S-transferase) и мечения UBL (ubiquitin-like domain)	+	+	+	+	+		[78]
<i>Oryctolagus cuniculus</i> , печень	высокоскоростное ультрацентрифугирование, фракционирование сульфатом аммония	+	+	+	+	+	оптический биосенсор (поверхностный плазмонный резонанс)	[77]
<i>O. cuniculus</i> , головной мозг	высокоскоростное ультрацентрифугирование, фракционирование сульфатом аммония	+	+	+	+	+	оптический биосенсор (поверхностный плазмонный резонанс)	[76, 77]

Примечание. Белки, принадлежащие к данным функциональным группам, не являются ни собственно протеасомными белками, ни компонентами убиквитин-протеасомной системы (убиквитиназы, деубиквитиназы и пр.). Они были идентифицированы в количестве нескольких десятков с помощью масс-спектрометрических методов во фракциях протеасом, выделенных из различных источников, и в ряде случаев их взаимодействие с протеасомами было подтверждено независимыми методами.

Функциональные группы ассоциированных с протеасомами белков:

I — компоненты цитоскелета и белки, вовлеченные в транспортировку внутриклеточных «грузов»;

II — защитные белки;

III — сигнальные белки и регуляторы активности ферментов;

IV — регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки;

Примечание к таблице (окончание).

V — метаболические ферменты, преимущественно мультифункциональные белки.

* Моноклональные антитела к FLAG-эпиту.

** Stable isotope labeling of amino acids in cell culture.

*** Quantitative analysis of tandem-affinity purified cross-linked (x) protein complexes.

**** *In vivo* cross-linking (X) assisted bimolecular tandem affinity purification strategy.

***** Использовали клетки, экспрессирующие beta 7 субъединицу 20S-протеасомы, меченной C-концевым НТВН-пептидом, содержащим два His(6)-фрагмента, специфический сайт протеазы TEV (Tobacco Etch Virus), биотинилирование *in vivo*, метод нековалентного связывания с образованием комплекса биотин-стрептавидин с последующей элюцией с применением протеазы TEV.

***** Смешивание по-разному меченных проб (MAP, Mixing after purification).

Фракционирование 26S-протеасом мозга оказывает существенное влияние на профиль связанных с коровой субчастицей (20S) белков. Число индивидуальных белков, идентифицированных во фракции 20S-протеасом мозга кролика, практически удваивается по сравнению с фракцией 26S-протеасом мозга [76, 77] преимущественно за счет метаболических ферментов, белков, участвующих в передаче сигнала и регуляции активности ферментов, защитных белков и белков-регуляторов экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки [77]. При фракционировании 26S-протеасом печени кролика число индивидуальных белков во фракции 20S-протеасом практически не изменяется по сравнению с фракцией 26S. Следует подчеркнуть, что сопоставление субпротеомов белков фракций 26S- и 20S-протеасом мозга и печени кролика выявило их высокую органную специфичность. Пул общих белков ($n = 35$) в основном представлен метаболическими и защитными белками, на долю которых приходится более 70% белков. Примечательно, что из 35 ассоциированных с протеасомами белков, общих для всех четырех фракций (фракции 26S и 20S мозга и печени), 10 принадлежат к так называемым мультифункциональным белкам. Среди них: ГАФД [84], α -енолаза [85, 86], фактор элонгации 1- α 1 [87], альдолаза [88, 89], глутатионпероксидаза [90, 91], белок теплового шока Hsp60 [92], лактатдегидрогеназа [93], триозофосфатизомераза [94]. Существенное расширение репертуара белков, связанных с коровой субчастицей протеасом (20S) мозга, после удаления белков 19S-субчастицы, указывает на то, что компонентам последней принадлежит важная роль в формировании протеасомного интерактома и его регуляции. Во всяком случае, профили митохондриальных белков мозга крысы, связывающихся с субъединицей Rpn10 19S-субчастицы протеасом, существенно различались при введении животным нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) и нейропротектора изатина [95].

Поскольку субъединица Rpn10 19S-протеасом играет важную роль в узнавании субстратов, предназначенных для протеолитической деградации в протеасомах [96, 97], это согласуется с представлениями о том, что именно субъединицы 19S-протеасом определяют упорядоченное поступление белков, подвергающихся протеолитической деградации в коровой субчастице. При этом нельзя не отметить тот факт, что вопреки общепринятому представлению о том, что протеасомные рецепторы убиквитина — субъединицы Rpn10 и Rpn13 — взаимозаменяемы в контексте функционирования протеасом [25], профили белков мозга, связывающихся Rpn10- и Rpn13-субъединицами *in vitro*, существенно различались [98]. Это согласуется с результатами, полученными другими авторами на дрожжах [72]. По их данным, профили белков, взаимодействующих с субъединицами 19S-протеасомы Rpn1, Rpn10, Rpn11 и Rpn15, не полностью идентичны.

В контексте известных данных о внутриклеточном трафике протеасом и их транслокации в различные компартменты клетки в зависимости от функционального состояния клетки [42–45] существование большого числа белков, взаимодействующих с протеасомами и формирующих протеасомный интерактом, вполне объяснимо.

Краткая характеристика групп белков, взаимодействующих с протеасомами. Будучи широко представленным надмолекулярным комплексом в клетках мозга и периферических тканях [64, 99], протеасомы обнаруживаются в ядре и в цитоплазме, где они связаны с различными субклеточными структурами, включая хроматин, цитоскелет, ядерную оболочку, плазматическую мембрану, цитозольную мембрану. При этом их распределение в клетках неравномерно, и конкретная субклеточная локализация протеасом часто зависит от типа клеток, статуса роста и динамически меняющихся регуляторных стимулов [64, 100]. В контексте молекулярных механизмов пластичности мозга локализация компонентов УПС служит важным регулятором синаптической

функции, а нейрональные протеасомы могут взаимодействовать с внутриклеточными мембранными структурами, включая синаптические везикулы, везикулы аппарата Гольджи, митохондрии и лизосомы [101]. Локальные нарушения протеасомной деградации вовлечены в развитие многих нейродегенеративных заболеваний [102, 103].

(I) Компоненты цитоскелета и белки, вовлеченные в транспортировку внутриклеточных «грузов», и их роль в локализации протеасом в различных компартментах клетки. Один из молекулярных моторов — динеиновый комплекс — играет ключевую роль в подвижности протеасом в аксонах [104, 105].

Перераспределение 26S-протеасом в нейронах и других типах клеток обеспечивается путем взаимодействия с компонентами цитоскелета, который, в свою очередь, подвергается ремоделированию при участии протеасом [106]. Для размещения протеасом в синапсах нейроны используют зависимые от микротрубочек молекулярные моторы.

В нейронах дрозодилы компонентами зависимого от микротрубочек протеасомного транспорта служат белки легкой цепи динеина (DYNLL1/2) [105].

В связывании протеасом с белками DYNLL1/2 важную адаптерную роль играет консервативный связывающий протеасомы белок PI31 [107, 108]. Фосфорилирование с помощью p38 MAPK увеличивало связывание PI31 с DYNLL1/2, стимулировало образование комплексов протеасома—DYNLL1/2 и способствовало направленному движению протеасом в аксонах [108]. Инактивация PI31 нарушала взаимодействие легких цепей динеина с протеасомами и транспорт последних в аксоны. Это приводило к изменению пресинаптических зон и способствовало развитию дефектов белкового гомеостаза на периферии нейронов. Кроме того, PI31 прочно связывается с F-box-белком Ntc/FBXO7/PARK15 [107, 108], мутации которого сопровождаются нарушением функций протеасом и вызывают развитие ювенильной формы болезни Паркинсона [109]. Другой адаптерный белок, Escm29, связываясь с миозинами и кинезинами, способствует взаимодействию протеасом с различными компартментами клеток [110]. Нокдаун тяжелой цепи моторного белка кинезина 1 (KIF5B) приводит к нарушению дендритного транспорта, процессов обучения и памяти [111] и антероградного движения протеасом к аксонам [101]. Факторы, способствующие росту аксонов, стимулировали ретроградный транспорт протеасом из

растущих терминалей аксонов, который регулировался посредством фосфорилирования адаптерного белка протеасом Escm29, взаимодействующего с динеином [104].

(II) Защитные белки. Помимо участия в сборке протеасом, клеточные шапероны участвуют в протеолитической деградации белков протеасомами. Члены семейства Hsp70 непосредственно вовлечены в процессы деградации белков путем доставки белковых субстратов к протеасоме. При этом участие Hsc70/Hsp70 в деградации белков 26S-протеасомой опосредует кошаперон CHIP (carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein). Он действует как убиквитинлигаза, а белок BAG1 (BCL2-associated athanogene) координирует связывание Hsp70-субстратного комплекса с 26S-протеасомой [112–114]. В случае протеолитической элиминации окисленных белков протеасомами клетки используют протеолитические возможности 20S-протеасомы, осуществляя диссоциацию 26S-протеасомы. В этом процессе важная роль принадлежит белку теплового шока 70 (Hsp70), который способствует увеличению количества свободных 20S-протеасом и предотвращает накопление окисленных белков в клетках в условиях окислительного стресса [115]. В ходе формирования клеточного ответа на окислительный стресс Hsp70 может взаимодействовать и с окисленными белками, и с 20S-протеасомой, которая, в отличие от 26S-протеасомы, способна распознавать и расщеплять развернутые белки АТР- и убиквитин-независимым способом [116]. Протеасома 20S узнает свои субстраты по их неструктурированным гидрофобным участкам, экспонированным наружу в результате разворачивания белковой молекулы [7–11]. При этом протеасома 20S значительно более устойчива к окислительному стрессу, чем протеасома 26S [117, 118]. Устойчивости 20S-протеасомы к окислительному повреждению способствует Hsp90 [119]. Hsp90 также связывается с окисленным кальмодулином [120], представленность которого в протеасомах мозга превышает уровень ряда субъединиц протеасом [76], и способствует деградации этого регуляторного белка 20S-субчастицей.

(III) Сигнальные белки и регуляторы активности ферментов. Фосфорилирование играет важную роль в регуляции протеасом и их субклеточной локализации. Ретроградный транспорт протеасом зависит от стадии развития нейрона и увеличивается по мере роста аксонов [104]. Это процесс стимулируют cAMP и мозговой нейротрофический фактор (BDNF), не влияя на антероградное направление.

Регуляторный механизм включает BDNF/сАМР-зависимую активацию РКА и фосфорилирование адаптерного белка 26S-протеасомы Ecm29, которое усиливает взаимодействие протеасомы с динеином. В качестве главного регулятора (так называемого master regulator) синапсов рассматривают α -субъединицу Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII α) [58], которая в мозге ассоциирована с протеасомами [121]. Транслокация этого фермента в синапс способствует накоплению протеасом в шипиках и их постсинаптическому перераспределению. Автофосфорилирование CaMKII α усиливает связывание с протеасомами и мобилизацию последних в шипики. Действие CaMKII α на протеасомы осуществляется посредством некаталитического и каталитического механизмов. В первом случае активированная (автофосфорилированная) CaMKII α эффективнее связывается с протеасомами, способствуя их мобилизации к шипикам. Во втором случае CaMKII α стимулирует активность протеасом, фосфорилируя остаток серина (Ser120) субъединицы Rpt6. Однако для деградации полиубиквитинированных белков шипиков важное значение имеет именно транслокация CaMKII α , а не ее киназная активность [121]. Тем не менее, по данным других авторов, блокада этого фосфорилирования у мутантного белка с аминокислотной заменой S120A или ингибирование CaMKII α снижают синаптическую активность и рост шипиков [122, 123]. Кондиционирование страха сопровождалось увеличением фосфорилирования Ser120 Rpt6-субъединицы регуляторной субчастицы протеасом и активности протеасом в миндалевидном теле крыс Лонг-Эванс (Long Evans) [124]. Введение специфического ингибитора CaMKII — myr-AIP (myristoylated autocalcinein-2 related inhibitory peptide) — приводило к значительному снижению индуцированного обучением увеличения фосфорилирования Ser120 Rpt6-субъединицы и активности протеасом, не влияя на уровни полиубиквитинирования белков. Специфический ингибитор РКА таким действием не обладал. Эти и другие данные свидетельствуют в пользу того, что CaMKII участвует в формировании памяти, регулируя фосфорилирование Rpt6 и функцию протеасом [124, 125].

Полоподобная протеинкиназа 1 (polo-like kinase 1 — фермент семейства серин-треониновых киназ, участвующий в регуляции клеточного цикла, ответов клетки на повреждение ДНК и др.) активирует 20S-протеасому, фосфорилируя α -субъединицу [126]. Однако

роль этой киназы, которую некоторые авторы называют протеасомной протеинкиназой [58], в пластичности мозга пока остается невыясненной. Известно, что ингибирование этого фермента блокирует прогрессию клеточного цикла при некоторых глиомах [127].

Кальмодулин — активатор Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II — обнаруживается при протеомном профилировании фракций 26S- и 20S-протеасом мозга [76, 77]. С учетом известных данных о диссоциации кальмодулина от CaMKII [128] обнаружение этого белка в протеасомах может свидетельствовать о его потенциальной роли в качестве регулятора CaMKII и, возможно, других кальмодулин-зависимых ферментов, связанных с протеасомами. Нельзя исключить также и поступление этого белка к месту протеолитической деградации. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что свободный кальмодулин, лишенный ионов Ca^{2+} , подвергается деградации, не требующей убиквитинирования как 26S-, так и 20S-протеасомами [120, 129].

(IV) Регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки клеток. Значительное количество протеасом находится в ядре, где они играют ключевую роль в регуляции клеточного цикла, транскрипции, ремоделирования хроматина, эпигенетического контроля, сплайсинга РНК, восстановления повреждений ДНК и контроля качества ядерных белков [64, 130]. В связи с этим регуляторы экспрессии генов, стабильности генома и дифференцировки, обнаруживаемые во фракции протеасом, могут рассматриваться в качестве потенциальных субстратов, подлежащих протеолитической деградации. Фактор элонгации eEF1A, играющий важную роль в долговременной синаптической пластичности [131], связывается с протеасомами [76, 77, 132]. Уровень этого белка снижен в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера [133]. С другой стороны, есть сообщения о том, что фактор элонгации eEF1A связывает аберрантные белки, высвобождающиеся с рибосом, и доставляет их в протеасомы для последующей деградации [132]. eEF1A взаимодействует преимущественно с Rpt1-субъединицей регуляторной 19S-субчастицы, а также с убиквитинированными белками [132]. Наиболее сильное взаимодействие отмечено при истощении АТФ; при делеции гена, кодирующего Rpt1-субъединицу, связывание eEF1A с протеасомой снижалось, но не исчезало совсем [132]. Это свидетельствует о том, что eEF1A может связываться и с другими компо-

нентами протеасом. Последнее, по-видимому, объясняет тот факт, что в мозге eEF1A обнаруживается как во фракции 26S-протеасом, так и во фракции 20S-протеасом [76, 77].

(V) Метаболические ферменты. Метаболические ферменты, ассоциированные с протеасомами и обнаруженные в протеасомах, выделенных из различных биологических объектов [69, 70, 72, 73, 75–78], вовлечены практически во все виды обмена. При этом только гликолитические ферменты, обнаруженные в протеасомах (рис. 3) и снабжающие их энергией АТФ в реакциях субстратного фосфорилирования, по-видимому, могут рассматриваться в качестве функционально значимых. Во всяком случае, субъединицам митохондриального АТФ-синтазного комплекса [73, 78] или транспортных АТФаз [76, 77] трудно «предложить работу по специальности» в протеасомах. По-видимому, часть этих ферментов (например, уже упоминавшаяся ранее ГАФД), не подлежащая деградации в протеасомах, может выполнять

неканонические функции, действуя, например, в качестве шаперонов или белков-ингибиторов 20S-протеасомы [134]. С другой стороны, субъединицы лактатдегидрогеназы [76, 77], входящие в состав лактатоксидазного комплекса, обнаруженного в нейронах мозга крыс [135], могут служить одним из связующих звеньев между компонентами протеасомного интерактома и митохондриями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеасомный интерактом содержит большое количество белков, которые принимают участие в сборке этих надмолекулярных комплексов, регуляции функционирования и внутриклеточной локализации. При экстраполяции на мозг человека данных, полученных на различных биологических объектах, ассоциированные с протеасомами белки составляют не менее 28% протеома мозга человека (рис. 4).

В контексте молекулярных функций Gene Ontology (GO) Pathways белки протеасомного интерактома обеспечивают взаимодействие компонентов более 30 метаболических путей, аннотированных в терминах GO (рис. 5) [136]. Главным итогом этих взаимодействий, по-видимому, является связывание адениновых и гуаниновых нуклеотидов, которые, очевидно,

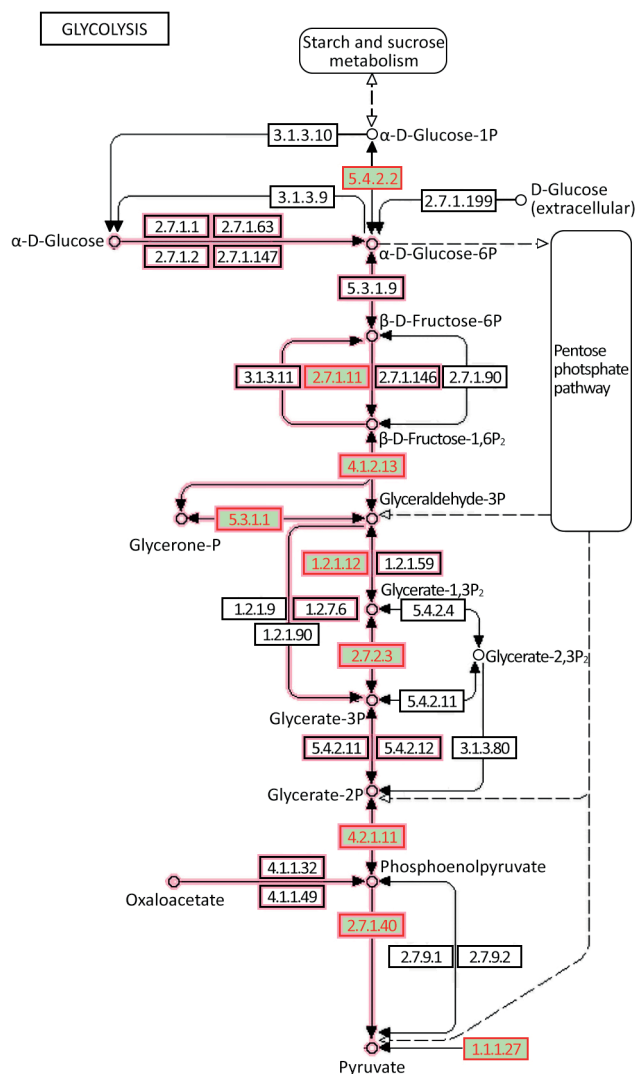


Рис. 3. Обогащение протеасом ферментами гликолиза, идентифицированными в мозге кролика [76, 77]. Красным цветом обозначены те реакции гликолиза, участниками которых являются обнаруженные белки. Блоки, заполненные зеленым цветом, показывают идентифицированные белки, которые обозначены номерами в классификации ферментов, а также идентификаторами KEGG и UniProtKB: фосфоглюкомутаза-1 (EC 5.4.2.2; идентификатор KEGG – K01835, идентификатор UniProtKB – P36871), АТФ-зависимая 6-фосфофруктокиназа (EC 2.7.1.11; идентификатор KEGG – K00850, идентификатор UniProtKB – P308237), фруктозобисфосфатальдолаза А (EC 4.1.2.13; идентификатор KEGG – K01623, идентификатор UniProtKB – P04075), триозофосфатизомераза (EC 5.3.1.1; идентификатор KEGG – K01803, идентификатор UniProtKB – P60174), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (EC 1.2.1.12; идентификатор KEGG – K00134, идентификатор UniProtKB – P04406), фосфоглицераткиназа 2 (EC 2.7.2.3; идентификатор KEGG – K00927, идентификатор UniProtKB – P07205), альфа-енолаза (EC 4.2.1.11; идентификатор KEGG – K01689, идентификатор UniProtKB – P06733), пируваткиназа PKM (EC 2.7.1.40; идентификатор KEGG – K00873, идентификатор UniProtKB – P14618), L-лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27; идентификатор KEGG – K00016, идентификатор UniProtKB – P00338). Изображение адаптировано и взято из открытого ресурса KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa Laboratory) с разрешения правообладателя. Идентификатор оригинальной карты гликолиза KEGG – map00010 [15]

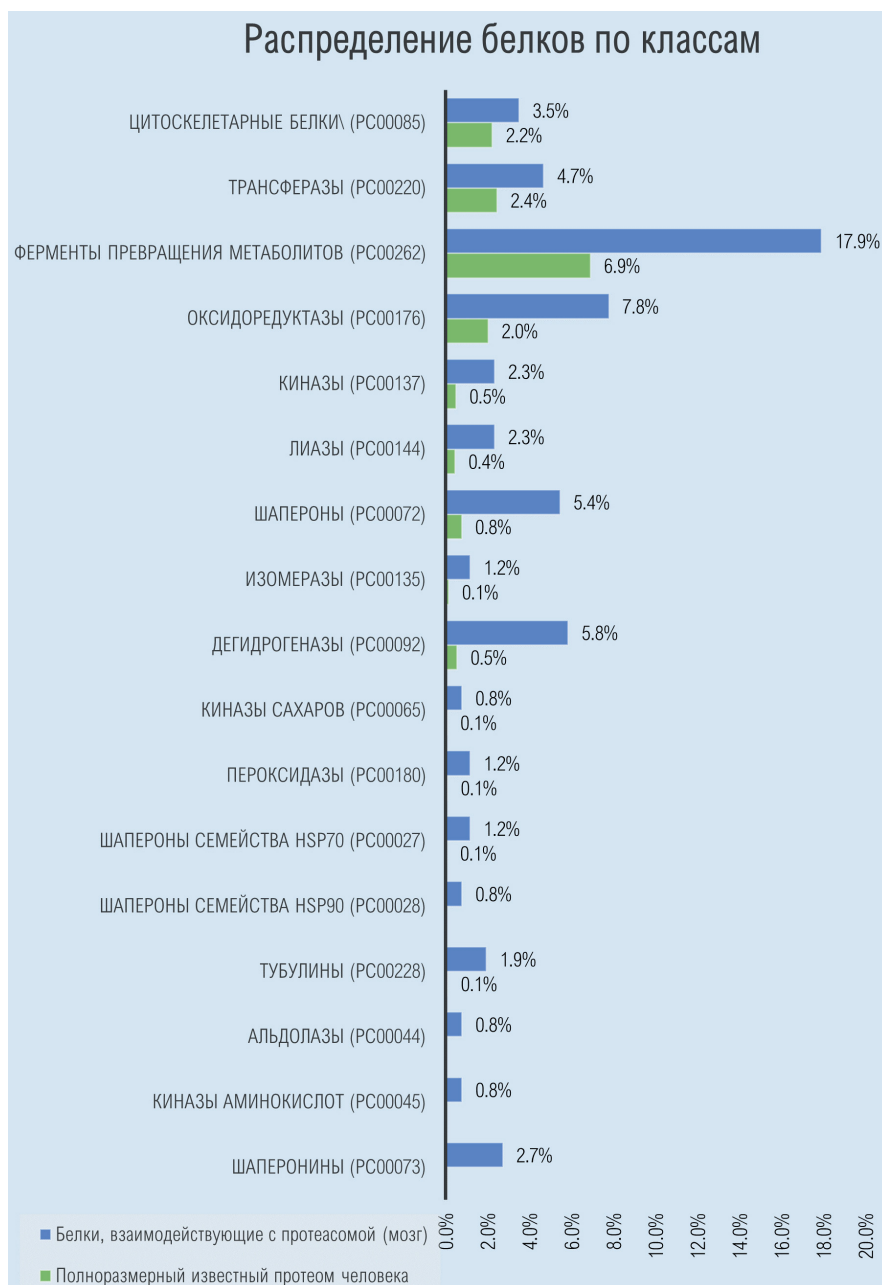


Рис. 4. Функциональные классы (Protein Classes) ассоциированных с протеасомами белков, идентифицированных в мозге кролика [76, 77] и экстраполированных на протеом человека. Белки, ассоциированные с протеасомой, подразделяются на несколько функциональных классов в соответствии с данными анализа ресурса GO Slims <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>. Синим цветом обозначен вклад белков в идентифицированном субпротеоме, ассоциированном с протеасомами, зеленым цветом отмечен вклад идентичного функционального класса в полноразмерном человеческом протеоме. Функциональные классы белков (обозначены в скобках) приведены в номенклатуре ресурса Quick GO Explore Biology

и обеспечивают реализацию нуклеотид-зависимых функций 26S- и 20S-протеасом [31, 137, 138] в клетках центральной нервной системы и периферических тканей.

Участие протеасом в патогенезе различных заболеваний центральной нервной системы и периферических тканей делают эти надмолекулярные комплексы привлекательным объектом таргетной фармакологической регуляции.

Хотя в данной области преобладает явный интерес к разработке и применению ингибиторов протеасом для лечения различных видов рака, фармакологической регуляции функциональной активности протеасом мозга также уделяется определенное внимание. Поскольку развитие нейродегенеративной патологии чаще всего связано с региоселективным снижением функциональной активности

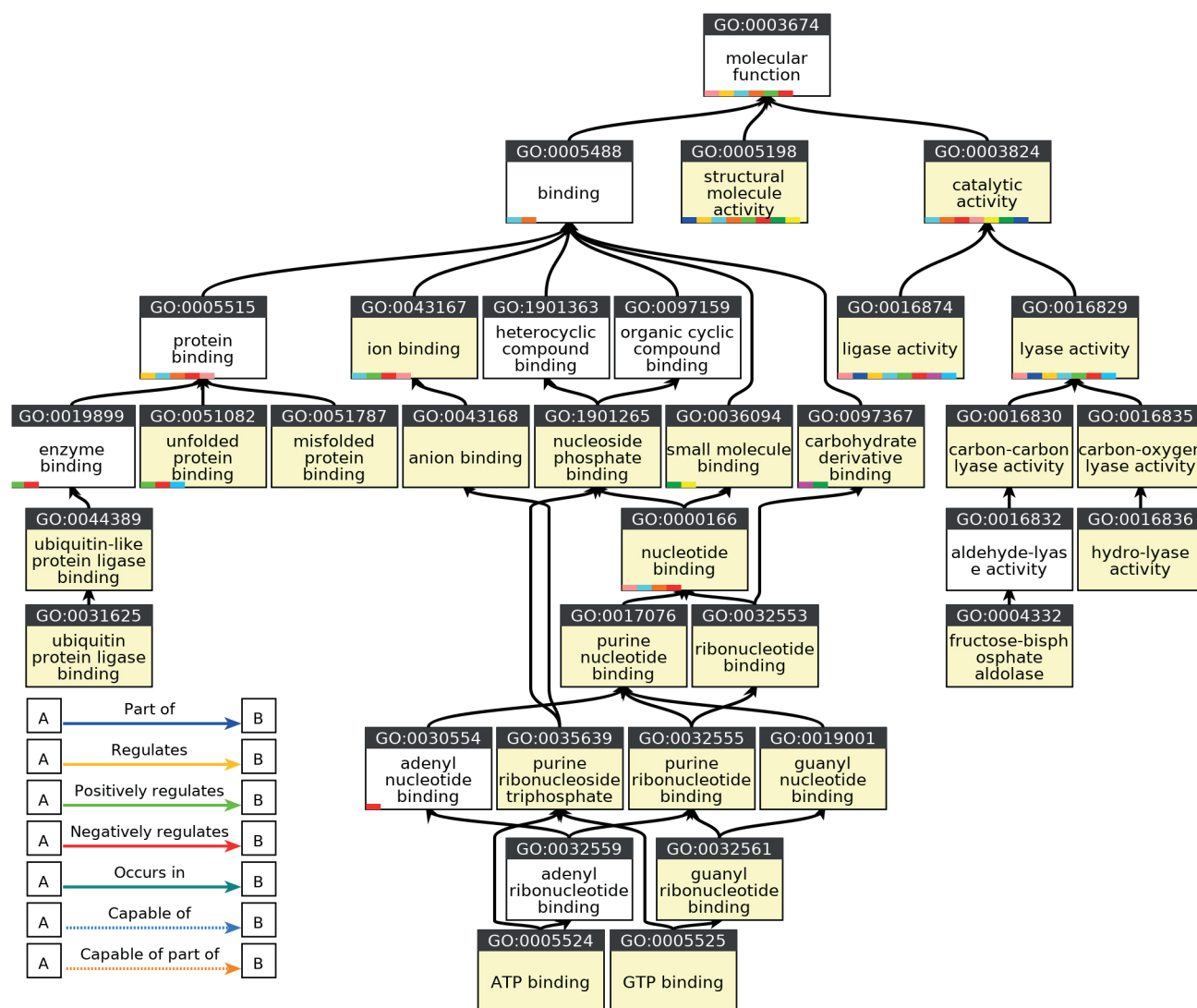


Рис. 5. Молекулярные функции белков мозга [76, 77], ассоциированных с протеасомами. Дерево распределения и взаимосвязи функциональных классов, соответствующих белкам, ассоциированным с протеасомами, реконструировано с использованием ресурса PANTHER™ Protein Class (версия 17.0, дата обновления 2022-02-22; <http://pantherdb.org/>) [136]. Анализ группировки функциональных классов выполнен с поправкой FDR < 0,001 против полноразмерного протеома человека. Желтым цветом выделены блоки классов, к которым принадлежат обнаруженные белки, ассоциированные с протеасомой; белым цветом отмечены блоки функциональных классов, отвечающих или сопряженных с функциональными активностями белков, ассоциированными с протеасомами. Идентификаторы молекулярных функций приведены в номенклатуре Gene Ontology. Цветовые индикаторы в блоках отражают направление воздействия (активности) соседних или связанных блоков

протеасом, положительный терапевтический эффект, очевидно, будут оказывать факторы, способствующие повышению активности протеасом. В качестве одного из основных подходов в настоящее время рассматривается возможность фармакологического торможения активности деубиквитинов [109]. Блокада этих ферментов способствует поступлению убиквитинированных субстратов в протеасомы для последующей протеолитической деградации. Другой подход, предполагающий посттрансляционную модификацию субъединиц протеасомного комплекса, связан с рядом компонентов протеасомного субпротеома (РКА,

СаМКIIα и др.) [139]. В любом случае фармакологическая регуляция протеасом мозга, по-видимому, реализуется через изменение состава и/или активности белков, ассоциированных с протеасомами. Результаты исследований, проведенных на модельных объектах *in vitro* и *in vivo* [139], внушают определенный оптимизм в плане реализуемости данного подхода.

Вклад авторов. О.А. Бунеева – анализ собственных и литературных данных по теме, написание глав обзора; А.Т. Копылов – биоинформатический анализ массивов протеомных

данных, подготовка иллюстративного материала, участие в написании глав обзора по ассоциированным с протеасомами белкам; А.Е. Медведев — концепция обзора, написание отдельных глав обзора, научное редактирование.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100170–5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная работа не предполагала использования людей и животных в качестве объектов исследования. Исследования авторов оригинальных работ, результаты которых обобщены в данном обзоре, были выполнены с одобрения соответствующих комитетов по этике, указанных в каждой процитированной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tanaka, K. (2009) The proteasome: overview of structure and functions, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **85**, 12–36, doi: 10.2183/pjab.85.12.
2. Schmidt, M., and Finley, D. (2014) Regulation of proteasome activity in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 13–25, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.012.
3. Goldberg, A. L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins, *Nature*, **426**, 895–899, doi: 10.1038/nature02263.
4. Herskho, A., and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761–807, doi: 10.1146/annurev.bi.61.070192.003553.
5. Driscoll, J., and Goldberg, A. L. (1990) The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins, *J. Biol. Chem.*, **265**, 4789–4792, doi: 10.1016/S0021-9258(19)34041-4.
6. Schwartz, A. L., and Ciechanover, A. (2009) Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **49**, 73–96, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340.
7. Ben-Nissan, G., and Sharon, M. (2014) Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway, *Biomolecules*, **4**, 862–884, doi: 10.3390/biom4030862.
8. Orlowski, M., and Wilk, S. (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome, *Arch. Biochem. Biophys.*, **415**, 1–5, doi: 10.1016/s0003-9861(03)00197-8.
9. Eroles, J., and Coffino, P. (2014) Ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 216–221, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.05.008.
10. Sánchez-Lanzas, R., and Castaño, J. G. (2014) Proteins directly interacting with mammalian 20S proteasomal subunits and ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biomolecules*, **4**, 1140–1154, doi: 10.3390/biom4041140.
11. Бунеева О. А., Медведев А. Е. (2018) Убиквитин-независимая деградация белков в протеасомах, *Биомед. Хим.*, **64**, 134–148, doi: 10.18097/PBMC20186402134.
12. Uversky, V. N., Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2005) Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling, *J. Mol. Recognit.*, **18**, 343–384, doi: 10.1002/jmr.747.
13. Sharon, M., Witt, S., Felderer, K., Rockel, B., Baumeister, W., and Robinson, C. V. (2006) 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 9569–9575, doi: 10.1074/jbc.M511951200.
14. Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., and Martin, A. (2018) Structure and function of the 26S proteasome, *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 697–724, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011931.
15. Kanehisa, M., Sato, Y., and Kawashima, M. (2022) KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data, *Protein Sci.*, **31**, 47–53, doi: 10.1002/pro.4172.
16. Pickering, A. M., and Davies, K. J. A. (2012) Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 alpha beta, Pa28 gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **523**, 181–190, doi: 10.1016/j.abb.2012.04.018.
17. Funderburk, K. E., Kang, J., and Li, H. J. (2022) Regulation of life & death by REGγ, *Cells*, **11**, 2281, doi: 10.3390/cells11152281.
18. Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., and García-González, V. (2015) Protein folding and mechanisms of proteostasis, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 17193–17230, doi: 10.3390/ijms160817193.
19. Fu, H., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., and Vierstra, R. D. (1998) Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1, *J. Biol. Chem.*, **273**, 1970–1981, doi: 10.1074/jbc.273.4.1970.
20. Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K. J., and Groll, M. (2008) Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-

- homology domain interaction, *Nature*, **453**, 548-552, doi: 10.1038/nature06924.
21. Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D., and Dikic, I. (2008) Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor, *Nature*, **453**, 481-488, doi: 10.1038/nature06926.
 22. Shi, Y., Chen, X., Elsasser, S., Stocks, B. B., Tian, G., Lee, B. H., Shi, Y., Zhang, N., de Poot, S. A. H., Tuebing, F., Sun, S., Vannoy, J., Tarasov, S. G., Engen, J. R., Finley, D., and Walters, K. J. (2016) Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome, *Science*, **351**, 6275, doi: 10.1126/science.aad9421.
 23. Martinez-Fonts, K., Davis, C., Tomita, T., Elsasser, S., Nager, A. R., Shi, Y., Finley, D., and Matouschek, A. (2020) The proteasome 19S cap and its ubiquitin receptors provide a versatile recognition platform for substrates, *Nat. Commun.*, **11**, 477, doi: 10.1038/s41467-019-13906-8.
 24. Liu, Z., Dong, X., Yi, H. W., Yang, J., Gong, Z., Wang, Y., Liu, K., Zhang, W. P., and Tang, C. (2019) Structural basis for the recognition of K48-linked Ub chain by proteasomal receptor Rpn13, *Cell. Discov.*, **5**, 19, doi: 10.1038/s41421-019-0089-7.
 25. Kish-Trier, E., and Hill, C. P. (2013) Structural biology of the proteasome, *Annu. Rev. Biophys.*, **42**, 29-49, doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130417.
 26. Da Fonseca, P. C., and Morris, E. P., (2008) Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23305-23314, doi: 10.1074/jbc.M802716200.
 27. Sahu, I., and Glickman, M. H. (2021) Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome, *Biochem. Soc. Trans.*, **49**, 629-644, doi: 10.1042/BST20200382.
 28. Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., Walz, T., Ploegh, H., and Finley, D. (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function, *Mol. Cell*, **10**, 495-507, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00638-x.
 29. Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., and Martin, A. (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle, *Nature*, **482**, 186-191, doi: 10.1038/nature10774.
 30. Guterman, A., and Glickman, M. H. (2004) Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome, *J. Biol. Chem.*, **279**, 1729-1738, doi: 10.1074/jbc.M307050200.
 31. Smith, D. M., Chang, S. C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., and Goldberg, A. L. (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry, *Mol. Cell.*, **27**, 731-744, doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.033.
 32. Gallastegui, N., and Groll, M. (2010) The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine, *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 634-642, doi: 10.1016/j.tibs.2010.05.005.
 33. Kleijnen, M. F., Roelofs, J., Park, S., Hathaway, N. A., Glickman, M., King, R. W., and Finley, D. (2007) Stability of the proteasome can be regulated allosterically through engagement of its proteolytic active sites, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1180-1188, doi: 10.1038/nsmb1335.
 34. Yazgili, A. S., Ebstein, F., and Meiners, S. (2022) The proteasome activator PA200/PSME4: an emerging new player in health and disease, *Biomolecules*, **12**, 1150, doi: 10.3390/biom12081150.
 35. Griffin, T. A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H. J., Kaer, L. V., Monaco, J. J., and Colbert, R. A. (1998) Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits, *J. Exp. Med.*, **187**, 97-104, doi: 10.1084/jem.187.1.97.
 36. Kloetzel, P. M., and Ossendorp, F. (2004) Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation, *Curr. Opin. Immunol.*, **16**, 76-81, doi: 10.1016/j.coi.2003.11.004.
 37. Johnston-Carey, H. K., Pomatto, L. C., and Davies, K. J. (2015) The immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **51**, 268-281, doi: 10.3109/10409238.2016.1172554.
 38. Ferrington, D. A., and Gregerson, D. S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **109**, 75-112, doi: 10.1016/B978-0-12-397863-9.00003-1.
 39. Wang, X., Chemmama, I. E., Yu, C., Huszagh, A., Xu, Y., Viner, R., Block, S. A., Cimermancic, P., Rychnovsky, S. D., Ye, Y., Sali, A., and Huang, L. (2017) The proteasome-interacting Ecm29 protein disassembles the 26S proteasome in response to oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **292**, 16310-16320, doi: 10.1074/jbc.M117.803619.
 40. Minis, A., Rodriguez, J. A., Levin, A., Liu, K., Govek, E. E., Hatten, M. E., and Steller, H. (2019) The proteasome regulator PI31 is required for protein homeostasis, synapse maintenance, and neuronal survival in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 24639-24650, doi: 10.1073/pnas.1911921116.
 41. Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., and Hochstrasser, M. (2017) Proteasome structure and assembly, *J. Mol. Biol.*, **429**, 3500-3524, doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.027.
 42. Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., and Ciechanover, A. (2016) The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death, *Cell Res.*, **26**, 869-885, doi: 10.1038/cr.2016.86.
 43. Rousseau, A., and Bertolotti, A. (2018) Regulation of proteasome assembly and activity in health

- and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 697-712, doi: 10.1038/s41580-018-0040-z.
44. Meul, T., Berschneider, K., Schmitt, S., Mayr, C. H., Mattner, L. F., Schiller, H. B., Yazgılı, A. S., Wang, X., Lukas, C., Schlessner, C., Prehn, C., Adamski, J., Graf, E., Schwarzmayer, T., Perocchi, F., Kukat, A., Trifunovic, A., Kremer, L., Prokisch, H., Popper, B., von Toerne, C., Hauck, S. M., Zischka, H., and Meiners, S. (2020) Mitochondrial regulation of the 26S proteasome, *Cell Rep.*, **32**, 108059, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108059.
 45. Enenkel, C., Kang, R. W., Wilfling, F., and Ernst, O. P. (2022) Intracellular localization of the proteasome in response to stress conditions, *J. Biol. Chem.*, **298**, 102083, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102083.
 46. Herter, J. R., and Fuchs, S. Y. (2002) Recognition of substrate and Skp1 by the Homologue of Slimb (HOS) ubiquitin ligase receptor D role of the F-box, *Med. Sci. Monit.*, **8**, BR283-BR288.
 47. Dawson, S., Hastings, R., Takayanagi, K., Reynolds, S., Low, P., Billett, M., and Mayer, R. J. (1997) The 26S-proteasome: regulation and substrate recognition, *Mol. Biol. Rep.*, **24**, 39-44, doi: 10.1023/a:1006800522814.
 48. Devine, T., and Dai, M. S. (2013) Targeting the ubiquitin-mediated proteasome degradation of p53 for cancer therapy, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 3248-3262, doi: 10.2174/1381612811319180009.
 49. de Almeida, M., Hinterndorfer, M., Brunner, H., Grishkovskaya, I., Singh, K., Schleiffer, A., Jude, J., Deswal, S., Kalis, R., Vunjak, M., Lendl, T., Imre, R., Roitinger, E., Neumann, T., Kandolf, S., Schutzbier, M., Mechtler, K., Versteeg, G. A., Haselbach, D., and Zuber, J. (2021) AKIRIN2 controls the nuclear import of proteasomes in vertebrates, *Nature*, **599**, 491-496, doi: 10.1038/s41586-021-04035-8.
 50. Uriarte, M., Sen Nkwe, N., Tremblay, R., Ahmed, O., Messmer, C., Mashtalir, N., Barbour, H., Masclef, L., Voide, M., Viallard, C., Daou, S., Abdelhadi, D., Ronato, D., Paydar, M., Darracq, A., Boulay, K., Desjardins-Lecavalier, N., Sapieha, P., Masson J.-Y., Sergeev, M., Kwok, B. H., Hulea, L., Mallette F. A., Milot, E., Larrivée, B., Wurtele, H., and Affar, E. B. (2021) Starvation-induced proteasome assemblies in the nucleus link amino acid supply to apoptosis, *Nat. Commun.*, **12**, 6984, doi: 10.1038/s41467-021-27306-4.
 51. Yasuda, S., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Guo, Q., Ikeuchi, K., Endo, A., Arai N., Ohtake, F., Murata, S., Inada, T., Baumeister, W., Fernández-Busnadiego, R., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2020) Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome, *Nature*, **578**, 296-300, doi: 10.1038/s41586-020-1982-9.
 52. Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments, *Nature*, **454**, 1088-1095, doi: 10.1038/nature07195.
 53. Gu, Z. C., Wu, E., Sailer, C., Jando, J., Styles, E., Eisenkolb, I., Kuschel, M., Bitschar, K., Wang, X., Huang, L., Vissa, A., Yip, C.M., Yedidi, R.S., Friesen, H., and Enenkel, C. (2017) Ubiquitin orchestrates proteasome dynamics between proliferation and quiescence in yeast, *Mol. Biol. Cell*, **28**, 2479-2491, doi: 10.1091/mbc.E17-03-0162.
 54. Fabunmi, R. P., Wigley, W. C., Thomas, P. J., and DeMartino, G. N. (2001) Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies, *J. Cell Sci.*, **114**, 29-36, doi: 10.1242/jcs.114.1.29.
 55. Mediani, L., Guillen-Boixet, J., Vinet, J., Franzmann, T. M., Bigi, I., Mateju, D., Carrà, A.D., Morelli, F.F., Tiago, T., Poser, I., Alberti, S., and Carra, S. (2019) Defective ribosomal products challenge nuclear function by impairing nuclear condensate dynamics and immobilizing ubiquitin, *EMBO J.*, **38**, 101341, doi: 10.15252/embj.2018101341.
 56. Ramachandran, K. V., and Margolis, S. S. (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 419-430, doi: 10.1038/nsmb.3389.
 57. Türker, F., Cook, E. K., and Margolis, S. S. (2021) The proteasome and its role in the nervous system, *Cell. Chem. Biol.*, **28**, 903-917, doi: 10.1016/j.chembiol.2021.04.003.
 58. Guo, X., Huang, X., and Chen, M. J. (2017) Reversible phosphorylation of the 26S proteasome, *Protein Cell*, **8**, 255-272, doi: 10.1007/s13238-017-0382-x.
 59. Myeku, N., Clelland, C. L., Emrani, S., Kukushkin, N. V., Yu, W. H., Goldberg, A. L., and Duff, K. E. (2016) Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling, *Nat. Med.*, **22**, 46-53, doi: 10.1038/nm.4011.
 60. VerPlank, J. J. S., Tyrkalska, S. D., Fleming, A., Rubinsztein, D. C., and Goldberg, A. L. (2020) CGMP via PKG activates 26S proteasomes and enhances degradation of proteins, including ones that cause neurodegenerative diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 14220-14230, doi: 10.1073/pnas.2003277117.
 61. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D. B., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (2003) O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome, *Cell*, **115**, 715-725, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00974-7.
 62. Cho-Park, P. F., and Steller, H. (2013) Proteasome regulation by ADP-ribosylation, *Cell*, **153**, 614-627, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.040.
 63. Gomes, A. V., Zong, C., Edmondson, R. D., Li, X., Stefani, E., Zhang, J., Jones, R. C., Thyparambil, S., Wang, G. W., Qiao, X., Bardag-Gorce, F., and Ping, P. (2006) Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes, *Circ. Res.*, **99**, 362-371, doi: 10.1161/01.RES.0000237386.98506.f7.

64. Guo, X. (2022) Localized proteasomal degradation: from the nucleus to cell periphery, *Biomolecules*, **12**, 229, doi: 10.3390/biom12020229.
65. Wang, D., Fang, C., Zong, N. C., Liem, D. A., Cadeiras, M., Scruggs, S. B., Yu, H., Kim, A. K., Yang, P., Deng, M., Lu, H., and Ping, P. (2013) Regulation of acetylation restores proteolytic function of diseased myocardium in mouse and human, *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 3793–3802, doi: 10.1074/mcp.M113.028332.
66. Bi, M., Du, X., Jiao, Q., Chen, X., and Jiang, H. (2021) Expanding the role of proteasome homeostasis in Parkinson's disease: beyond protein breakdown, *Cell Death Dis.*, **12**, 154, doi: 10.1038/s41419-021-03441-0.
67. Silva, G. M., Netto, L. E., Discola, K. F., Piassa-Filho, G. M., Pimenta, D. C., Bárcena, J. A., and Demasi, M. (2008) Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome, *FEBS J.*, **275**, 2942–2955, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06441.
68. Wang, X., Chen, C. F., Baker, P. R., Chen, P. L., Kaiser, P., and Huang, L. (2007) Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex, *Biochemistry*, **46**, 3553–3565, doi: 10.1021/bi061994u.
69. Tai, H. C., Besche, H., Goldberg, A. L., and Schuman, E. M. (2010) Characterization of the brain 26S proteasome and its interacting proteins, *Front. Mol. Neurosci.*, **3**, 12, doi: 10.3389/fnmol.2010.00012.
70. Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R. J. (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes, *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3425–3439, doi: 10.1091/mbc.11.10.3425.
71. Guerrero, C., Tagwerker, C., Kaiser, P., and Huang, L. (2006) An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified *in vivo* cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network, *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 366–378, doi: 10.1074/mcp.M500303-MCP200.
72. Guerrero, C., Milenkovic, T., Przulj, N., Kaiser, P., and Huang, L. (2008) Characterization of the proteasome interaction network using a QTAX-based tag-team strategy and protein interaction network analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13333–13338, doi: 10.1073/pnas.0801870105.
73. Зайкова Ю. Я., Куличкова В. А., Ермолаева Ю. Б., Боттрилл А., Барлев Н. А., Цимоха А. С. (2013) Характеристика внеклеточных протеасом и ассоциированных с ними белков методом iTRAQ-масс-спектрометрии, *Цитология*, **55**, 111–122, doi: 10.1134/S1990519X13030139.
74. Yu, C., Yang, Y., Wang, X., Guan, S., Fang, L., Liu, F., Walters, K. J., Kaiser, P., and Huang, L. (2016) Characterization of dynamic UbR-proteasome subcomplexes by *in vivo* cross-linking (X) assisted bimolecular tandem affinity purification (XBAP) and label-free quantitation, *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 2279–2292, doi: 10.1074/mcp.M116.058271.
75. Артамонова Т. О., Ходорковский М. А., Цимоха А. С. (2014) Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных протеасом из клеток миелогенной лейкемии человека линии K562, *Биоорг. Химия*, **40**, 720–734, doi: 10.1134/s1068162014060041.
76. Buneeva, O., Kopylov, A., Kaloshina, S., Zgoda, V., and Medvedev, A. (2021) 20S and 26S proteasome-binding proteins of the rabbit brain: a proteomic dataset, *Data Brief*, **38**, 107276, doi: 10.1016/j.dib.2021.107276.
77. Бунеева О. А., Копылов А. Т., Згода В. Г., Гнеденко О. В., Калошина С. А., Медведева М. В., Иванов А. С., Медведев А. Е. (2022) Сравнительный анализ белков, ассоциированных с 26S и 20S протеасомами мозга и печени кролика, *Биомед. Хим.*, **68**, 18–31, doi: 10.18097/PBMC20226801018.
78. Besche, H. C., Haas, W., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2009) Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins, *Biochemistry*, **48**, 2538–2549, doi: 10.1021/bi802198q.
79. Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bannink, J. R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature*, **404**, 770–774, doi: 10.1038/35008096.
80. Jia, J., Arif, A., Willard, B., Smith, J. D., Stuehr, D. J., Hazen, S. L., and Fox, P. L. (2012) Protection of extraribosomal RPL13a by GAPDH and dysregulation by S-nitrosylation, *Mol. Cell*, **47**, 656–663, doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.006.
81. Lazarev, V. F., Nikotina, A. D., Mikhaylova, E. R., Nudler, E., Polonik, S. G., Guzhova, I. V., and Margulis, B. A. (2016) Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **470**, 766–771, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.076.
82. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein, *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1265–1272, doi: 10.1074/mcp.M500061-MCP200.
83. Binns, D., Dimmer, E., Huntley, R., Barrell, D., O'Donovan, C., and Apweiler, R. (2009) QuickGO: a web-based tool for gene ontology searching, *Bioinformatics*, **25**, 3045–3046, doi: 10.1093/bioinformatics/btp536.

84. Kohr, M. J., Murphy, E., and Steenbergen, C. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart, *PLoS One*, **9**, 111448, doi: 10.1371/journal.pone.0111448.
85. Qiao, G., Wu, A., Chen, X., Tian, Y., and Lin, X. (2021) Enolase 1, a moonlighting protein, as a potential target for cancer treatment, *Int. J. Biol. Sci.*, **17**, 3981-3992, doi: 10.7150/ijbs.63556.
86. Didiasova, M., Schaefer, L., and Wygrecka, M. (2019) When place matters: shuttling of enolase-1 across cellular compartments, *Front. Cell Dev. Biol.*, **7**, 61, doi: 10.3389/fcell.2019.00061.
87. Ejiri, S. (2002) Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1-21, doi: 10.1271/bbb.66.1.
88. Pirovich, D. B., Da'dara, A. A., and Skelly, P. J. (2021) Multifunctional fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a therapeutic target, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 719678, doi: 10.3389/fmolb.2021.719678.
89. Gizak, A., Wiśniewski, J., Heron, P., Mamczur, P., Sygusch, J., and Rakus, D. (2019) Targeting a moonlighting function of aldolase induces apoptosis in cancer cells, *Cell Death Dis.*, **10**, 712, doi: 10.1038/s41419-019-1968-4.
90. Conrad, M., Schneider, M., Seiler, A., and Bornkamm, G. W. (2007) Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals, *Biol. Chem.*, **388**, 1019-1025, doi: 10.1515/BC.2007.130.
91. Haraguchi, C. M., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Yamada, A. T., Hoshi, K., and Yokota, S. (2003) Spatiotemporal changes of levels of a moonlighting protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, in subcellular compartments during spermatogenesis in the rat testis, *Biol. Reprod.*, **69**, 885-895, doi: 10.1095/biolreprod.102.013524.
92. Jeffery, C. J. (2018) Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **373**, 20160523, doi: 10.1098/rstb.2016.0523.
93. Brighenti, E., Carnicelli, D., Brigotti, M., and Fiume, L. (2017) The inhibition of lactate dehydrogenase A hinders the transcription of histone 2B gene independently from the block of aerobic glycolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**, 742-745, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.119.
94. Auer, J., Camoin, L., Courtot, A. M., Hotellier, F., and De Almeida, M. (2004) Evidence that P36, a human sperm acrosomal antigen involved in the fertilization process is triosephosphate isomerase, *Mol. Reprod. Dev.*, **68**, 515-523, doi: 10.1002/mrd.20107.
95. Медведев А. Е., Бунеева О. А., Копылов А. Т., Тихонова О. В., Медведева М. В., Неробкова Л. Н., Капица И. Г., Згода В. Г. (2017) Митохондриальный субпротеом Rpn10-связывающих белков мозга и его изменения, индуцированные нейротоксином МФТП и нейропротектором изатином, *Биохимия*, **82**, 470-480, doi: 10.1134/S0006297917030117.
96. Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., and Rechsteiner, M. (1994) A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates, *J. Biol. Chem.*, **269**, 7059-7061.
97. Hamazaki, J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S., Tanaka, K., and Murata, S. (2007) Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6629-6638, doi: 10.1128/MCB.00509-07.
98. Buneeva, O. A., Kopylov, A. T., and Medvedev, A. E. (2020) Qualitative difference of mitochondrial subproteomes of brain RPN10- and RPN13-binding proteins, *Biomed. Khim.*, **66**, 138-144, doi: 10.18097/PBMC20206602138.
99. Asano, S., Fukuda, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Förster, F., Danev, R., and Baumeister, W. (2015) Proteasomes. A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons, *Science*, **347**, 439-442, doi: 10.1126/science.1261197.
100. Wójcik, C., and DeMartino, G. N. (2003) Intracellular localization of proteasomes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**, 579-589, doi: 10.1016/s1357-2725(02)00380-1.
101. Otero, M. G., Alloatti, M., Cromberg, L. E., Almenar-Queralt, A., Encalada, S. E., Pozo Devoto, V. M., Bruno, L., Goldstein, L. S., and Falzone, T. L. (2014) Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function, *J. Cell Sci.*, **127**, 1537-1549, doi: 10.1242/jcs.140780.
102. Oddo, S. (2008) The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease, *J. Cell. Mol. Med.*, **12**, 363-373, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00276.x.
103. Yi, J. J., and Ehlers, M. D. (2007) Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function, *Pharmacol. Rev.*, **59**, 14-39, doi: 10.1124/pr.59.1.4.
104. Hsu, M. T., Guo, C. L., Liou, A. Y., Chang, T. Y., Ng, M. C., Florea, B. I., Overkleeft, H. S., Wu, Y. L., Liao, J. C., and Cheng, P. L. (2015) Stage-dependent axon transport of proteasomes contributes to axon development, *Dev. Cell*, **35**, 418-431, doi: 10.1016/j.devcel.2015.10.018.
105. Kreko-Pierce, T., and Eaton, B. A. (2017) The *Drosophila* LC8 homolog *cut up* specifies the axonal transport of proteasomes, *J. Cell Sci.*, **130**, 3388-3398, doi: 10.1242/jcs.207027.
106. Ibañez-Vega, J., Del Valle Batalla, F., Saez, J. J., Soza, A., and Yuseff, M. I. (2019) Proteasome dependent actin remodeling facilitates antigen extraction at the immune synapse of B cells, *Front. Immunol.*, **10**, 225, doi: 10.3389/fimmu.2019.00225.
107. Bader, M., Benjamin, S., Wapinski, O. L., Smith, D. M., Goldberg, A. L., and Steller, H. (2011) A conserved F box regulatory complex controls proteasome activity in *Drosophila*, *Cell*, **145**, 371-382, doi: 10.1016/j.cell.2011.03.021.
108. Liu, K., Jones, S., Minis, A., Rodriguez, J., Molina, M., and Steller, H. (2019) PI31 is an adaptor protein

- for proteasome transport in axons and required for synaptic development, *Dev. Cell*, **50**, 509-524, doi: 10.1016/j.devcel.2019.06.009.
109. Buneeva, O., and Medvedev, A. (2022) Atypical ubiquitination and Parkinson's disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3705, doi: 10.3390/ijms23073705.
 110. Gorbea, C., Pratt, G., Ustrell, V., Bell, R., Sahasrabudhe, S., Hughes, R. E., and Rechsteiner, M. (2010) A protein interaction network for Ecm29 links the 26 S proteasome to molecular motors and endosomal components, *J. Biol. Chem.*, **285**, 31616-31633, doi: 10.1074/jbc.M110.154120.
 111. Zhao, J., Fok, A. H. K., Fan, R., Kwan, P.Y., Chan, H. L., Lo, L. H., Chan, Y. S., Yung, W. H., Huang, J., Lai, C. S. W., and Lai, K. O. (2020) Specific depletion of the motor protein KIF5B leads to deficits in dendritic transport, synaptic plasticity and memory, *eLife*, **9**, e53456, doi: 10.7554/eLife.53456.
 112. Kundrat, L., and Regan, L. (2010) Balance between folding and degradation for Hsp90-dependent client proteins: a key role for CHIP, *Biochemistry*, **49**, 7428-7438, doi: 10.1021/bi100386w.
 113. Luders, J., Demand, J., and Hohfeld, J. (2000) The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome, *J. Biol. Chem.*, **275**, 4613-4617, doi: 10.1074/jbc.275.7.4613.
 114. Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein, *EMBO Rep.*, **2**, 1133-1138, doi: 10.1093/embo-reports/kve246.
 115. Reeg, S., Jung, T., Castro, J. P., Davies, K. J. A., Henze, A., and Grune, T. (2016) The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome, *Free Radic. Biol. Med.*, **99**, 153-166, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.002.
 116. Davies, K. J. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome, *Biochimie*, **83**, 301-310, doi: 10.1016/s0300-9084(01)01250-0.
 117. Reinhecke, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J., and Grune, T. (1998) Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress, *Biochem. J.*, **335**, 637-642, doi: 10.1042/bj3350637.
 118. Reinheckel, T., Ullrich, O., Sitte, N., and Grune, T. (2000) Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.*, **377**, 65-68, doi: 10.1006/abbi.2000.1717.
 119. Conconi, M., Petropoulos, I., Emod, I., Turlin, E., Biville, F., and Friguet, B. (1998) Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90, *Biochem. J.*, **333**, 407-415, doi: 10.1042/bj3330407.
 120. Whittier, J. E., Xiong, Y., Rechsteiner, M. C., and Squier, T. C. (2004) Hsp90 enhances degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome, *J. Biol. Chem.*, **279**, 46135-46142, doi: 10.1074/jbc.M406048200.
 121. Bingol, B., Wang, C. F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J., and Sheng, M. (2010) Autophosphorylated CaMKII α acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines, *Cell*, **140**, 567-578, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.024.
 122. Djakovic, S. N., Marquez-Lona, E. M., Jakawich, S. K., Wright, R., Chu, C., Sutton, M. A., and Patrick, G. N. (2012) Phosphorylation of Rpt6 regulates synaptic strength in hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, **32**, 5126-5131, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4427-11.2012.
 123. Hamilton, A. M., Oh, W. C., Vega-Ramirez, H., Stein, I. S., Hell, J. W., Patrick, G. N., and Zito, K. (2012) Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome, *Neuron*, **74**, 1023-1030, doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.031.
 124. Jarome, T. J., Kwapis, J. L., Ruenzel, W. L., and Helmstetter, F. J. (2013) CaMKII, but not protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories, *Front. Behav. Neurosci.*, **7**, 115, doi: 10.3389/fnbeh.2013.00115.
 125. Jarome, T. J., Ferrara, N. C., Kwapis, J. L., and Helmstetter, F. J. CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **128**, 103-109, doi: 10.1016/j.nlm.2016.01.001.
 126. Feng, Y., Longo, D. L., and Ferris, D. K. (2001) Polo-like kinase interacts with proteasomes and regulates their activity, *Cell Growth Differ.*, **12**, 29-37.
 127. Metselaar, D. S., du Chatinier, A., Meel, M. H., Ter Huizen, G., Waranek, P., Goulding, J. R., Bugiani, M., Koster, J., Kaspers, G. J. L., and Hulleman, E. (2022) AURKA and PLK1 inhibition selectively and synergistically block cell cycle progression in diffuse midline glioma, *iScience*, **25**, 104398, doi: 10.1016/j.isci.2022.104398.
 128. Colbran, R. J., and Brown, A. M. (2004) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **14**, 318-327, doi: 10.1016/j.conb.2004.05.008.
 129. Tarcsa, E., Szymanska, G., Lecker, S., O'Connor, C. M., and Goldberg, A. L. (2000) Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by *in vitro* aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination, *J. Biol. Chem.*, **275**, 20295-20301, doi: 10.1074/jbc.M001555200.
 130. Kito, Y., Matsumoto, M., Hatano, A., Takami, T., Oshikawa, K., Matsumoto, A., and Nakayama, K. I. (2020) Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin, *Sci. Rep.*, **10**, 5801, doi: 10.1038/s41598-020-62697-2.
 131. Beckelman, B. C., Day, S., Zhou, X., Donohue, M., Gouras, G. K., Klann, E., Keene, C. D., and Ma, T. (2016) Dysregulation of elongation factor 1A

- expression is correlated with synaptic plasticity impairments in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **54**, 669-678, doi: 10.3233/JAD-160036.
132. Chuang, S. M., Chen, L., Lambertson, D., Anand, M., Kinzy, T. G., and Madura, K. (2005) Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 403-413, doi: 10.1128/MCB.25.1.403-413.2005.
 133. Beckelman, B. C., Zhou, X., Keene, C. D., and Ma, T. (2016) Impaired eukaryotic elongation factor 1A expression in Alzheimer's disease, *Neurodegener. Dis.*, **16**, 39-43, doi: 10.1159/000438925.
 134. Olshina, M. A., Arkind, G., Deshmukh, F. K., Fainer, I., Taranavsky, M., Hayat, D., Ben-Dor, S., Ben-Nissan, G., and Sharon, M. (2020) Regulation of the 20S proteasome by a novel family of inhibitory proteins, *Antioxid. Redox Signal.*, **32**, 636-655, doi: 10.1089/ars.2019.7816.
 135. Hashimoto, T., Hussien, R., Cho, H. S., Kaufer, D., and Brooks, G. A. (2008) Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles, *PLoS One*, **3**, e2915, doi: 10.1371/journal.pone.0002915.
 136. Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. P., and Mi, H. (2022) PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all, *Protein Sci.*, **31**, 8-22, doi: 10.1002/pro.4218.
 137. Rabl, J., Smith, D. M., Yu, Y., Chang, S. C., Goldberg, A. L., and Cheng, Y. (2008) Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases, *Mol Cell*, **30**, 360-368, doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.004.
 138. Smith, D. M., Fraga, H., Reis, C., Kafri, G., and Goldberg, A. L. (2011) ATP binds to proteasomal ATPases in pairs with distinct functional effects, implying an ordered reaction cycle, *Cell*, **144**, 526-538, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.005.
 139. Myeku, N., and Duff K. E. (2018) Targeting the 26S proteasome to protect against proteotoxic diseases, *Trends Mol. Med.*, **24**, 18-29, doi: 10.1016/j.molmed.2017.11.006.

THE PROTEASOME INTERACTOME AND ITS ROLE IN THE MECHANISMS OF BRAIN PLASTICITY

Review

O. A. Buneeva, A. T. Kopylov, and A. E. Medvedev*

Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; E-mail: professor57@yandex.ru

Proteasomes are highly conserved multienzyme complexes responsible for the proteolytic degradation of short-lived, regulatory, misfolded, and damaged proteins. They play an important role in the processes of brain plasticity, and the decrease in their function is accompanied by the development of neurodegenerative pathology. Studies performed in different laboratories both on cultured mammalian and human cells and on preparations of the rat and rabbit brain cortex revealed a large number of proteasome-associated proteins. Since the identified proteins belong to certain metabolic pathways, multiple enrichment of the proteasome fraction with these proteins indicates their important role the proteasome functioning. Extrapolation of the experimental data, obtained on various biological objects, to the human brain, suggests that proteasome-associated proteins account for at least 28% of the human brain proteome. The proteasome interactome of the brain contains a large number of proteins involved in the assembly of these supramolecular complexes, regulation of their functioning, and intracellular localization, which can be changed at different conditions (for example, during oxidative stress) or in different phases of the cell cycle. In the context of the molecular functions of the Gene Ontology (GO) Pathways, the proteins of the proteasome interactome mediate cross-talk between components of more than 30 metabolic pathways annotated in terms of GO. The main result of these interactions is the binding of adenine and guanine nucleotides, crucial for realization of the nucleotide-dependent functions of the 26S and 20S proteasomes. Since the development of neurodegenerative pathology is often associated with a regiospecific decrease in the functional activity of proteasomes, a positive therapeutic effect will obviously be provided by factors increasing the proteasomal activity. In any case, the pharmacological regulation of brain proteasomes seems to be realized through changes in the composition and/or activity of proteins associated with proteasomes (deubiquitinase, PKA, CaMKII α , etc.).

Keywords: proteasomes, brain, 20S subunit, 19S subunit, subcellular localization and functions, proteasome-associated proteins, proteasome proteome and interactome

РОЛЬ ЛИПИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОГЛИАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Обзор

© 2023 О.В. Галкина^{1*}, О.В. Ветровой^{1,2}, И.Е. Красовская¹, Н.Д. Ещенко¹

¹ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра биохимии, 199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: o.v.galkina@spbu.ru

² ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 17.10.2022

После доработки 24.01.2023

Принята к публикации 26.01.2023

Липиды представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу соединений, что обуславливает большое разнообразие выполняемых ими биологических функций. Традиционное представление о липидах, как о важных структурных компонентах клетки и соединениях, играющих трофическую роль, в настоящее время дополняется сведениями о возможном участии липидов в сигналинге, причём не только внутриклеточном, но и межклеточном. В обзорной статье рассматриваются современные данные о роли липидов и их метаболитов, образующихся в глиальных клетках (астроциты, олигодендроциты, микроглия), в коммуникации этих клеток с нейронами. Помимо специфики метаболических превращений липидов в каждом типе глиальных клеток, отдельное внимание обращено на сигнальные молекулы липидной природы (фосфатидная кислота, арахидоновая кислота и её метаболиты, холестерин и др.) и возможность их участия в реализации синаптической пластичности, а также в других возможных механизмах, связанных с реализацией феномена нейропластичности. Обобщение этих новых данных может существенно расширить знания о регуляторных функциях липидов в нейроглиальных взаимоотношениях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ЦНС, головной мозг, синаптическая пластичность, нейроны, астроциты, олигодендроциты, микроглия, нейроглиальные взаимодействия, липиды, метаболизм липидов.

DOI: 10.31857/S0320972523030041, EDN: QWGKTA

ВВЕДЕНИЕ

Нейропластичность — фундаментальное свойство нервной системы, которое реализуется на различных уровнях и с помощью разных механизмов. В настоящее время наибольшее внимание привлекает изучение синаптической пластичности. Под синаптической пластичностью понимают способность образовывать новые связи, контакты, увеличивать проводимость между нейронами. Механизмы, поддерживающие синаптическую пластичность, включают в себя реорганизацию или новообразование синаптических структур, изменение количества выбрасываемого нейромедиатора и эффективности ответа на этот нейромедиатор, заключающиеся в модуляции плотности рецеп-

торов в постсинаптической мембране, а также проводимости ионных каналов и пр. Ремоделирование синапсов происходит в различных областях мозга на протяжении всей жизни.

Помимо разных типов нейронов, центральная нервная система (ЦНС) содержит морфологически и функционально различные популяции глиальных клеток, количественно преобладающих над нейронами в головном мозге млекопитающих и составляющих по массе от 33 до 66%. Глиальные клетки подразделяются на основные разновидности — астроциты, олигодендроциты, микроглию, эпендимальные клетки (рис. 1). Существуют также некоторые вариации внутри каждой из групп. Важно отметить, что каждый тип клеток выполняет специализированные функции [1, 2].

Принятые сокращения: АК — арахидоновая кислота; ДГК — дилицеролкиназа; ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; ЛП — липопротеины; ОЛ — олигодендроциты; ФК — фосфатидная кислота; Аро — аполипопротеин.

* Адресат для корреспонденции.

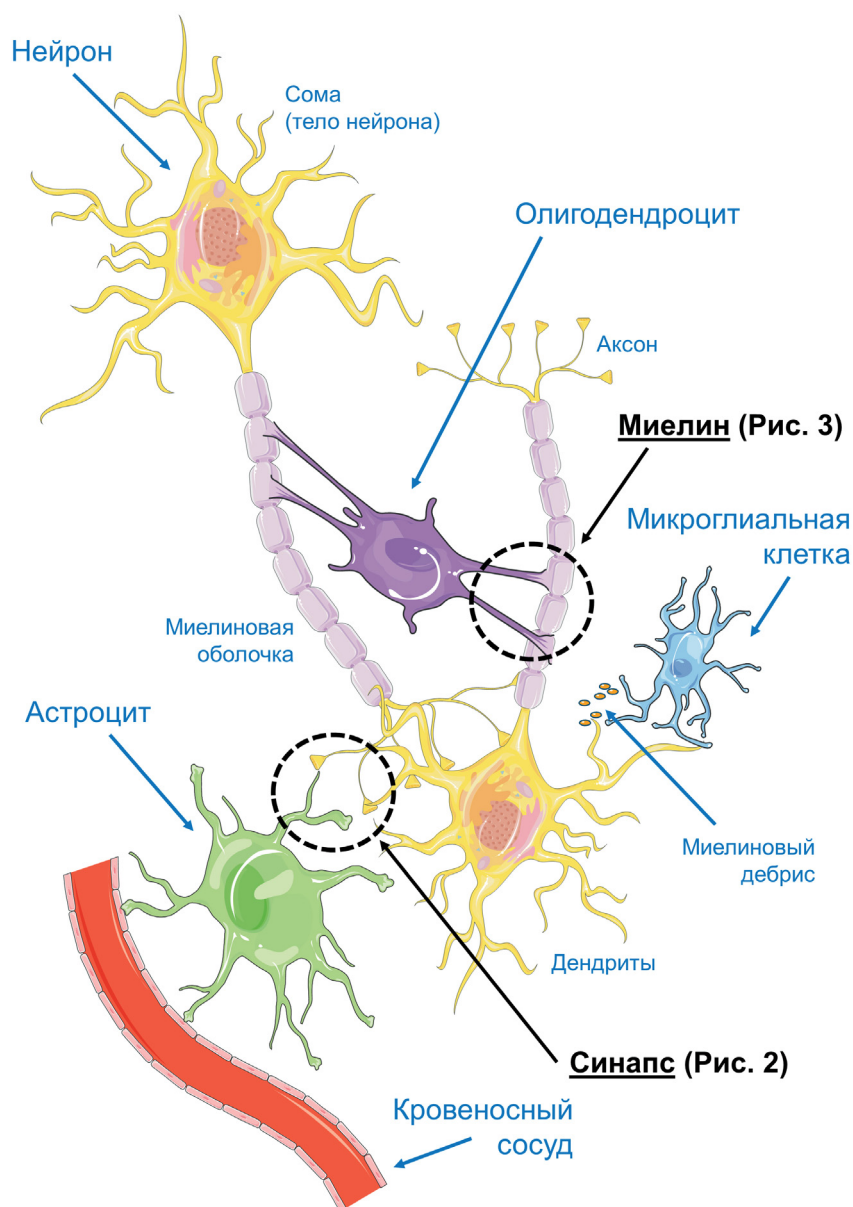


Рис. 1. Схема взаимодействия нейрона и глиальных клеток (астроцита, олигодендроцита, микроглиальной клетки). Кружками обведены места, которые более подробно представлены на рис. 2 и 3. Шаблоны, использованные для создания рисунка, находятся в свободном доступе на сайте Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>)

При этом из всех глиальных клеток астроциты наиболее тесно взаимодействуют со всеми участками нейронов (с телом клетки, дендритами, аксонами и синаптическими окончаниями). Олигодендроциты связаны главным образом с аксоном (в обонятельной луковице имеются миелинизированные дендриты), обеспечивая высокую скорость проведения нервного импульса за счёт формирования миелиновой оболочки; в периферической нервной системе за формирование миелина отвечает разновидность олигодендроцитов — шванновские клетки. Без участия клеток микроглии было бы невозможно полноценное протекание процессов апоптоза, митофагии. Кро-

ме того, показана существенная роль микроглиальных клеток в обеспечении контроля над формированием синаптических контактов во время созревания мозга. Эпендимальные клетки (эпендима) выстилают стенки желудочков головного мозга и спинномозгового канала и способствуют выработке спинномозговой жидкости. Базальная мембрана этих клеток контактирует с астроцитами, а зрелые нейроны в основном не вступают в прямое взаимодействие с клетками эпендимы, за исключением участков внутри и вокруг субэпендимальных зон [3].

Таким образом, тесная кооперация между нейронами и глиальными клетками, наряду с компартментализацией отдельных этапов

метаболизма между ними, необходимы для обеспечения правильного функционирования мозга. К настоящему времени накапливается всё больше доказательств важной роли липидов в коммуникации между нейронами и глиальными клетками при обеспечении механизмов пластичности мозга, нарушение которых сопряжено с широким спектром неврологических расстройств и нейродегенеративных заболеваний. Роль липидов в функционировании нейронов была описана нами ранее [4].

При изучении роли липидов в нейроглиальных взаимоотношениях внимание исследователей стала привлекать не только трофическая поддержка нейронов, но и выявление новых функций отдельных липидов — сигнальных и регуляторных. В этом отношении больше всего сведений получено на астроцитах, в то время как сигнальные функции липидов других глиальных клеток изучены фрагментарно. Работа в этом направлении представляет большой интерес и перспективна.

Следует подчеркнуть, что для липидов, в отличие от других классов соединений, весьма сложно разграничить «метаболические» и сигнальные функции. Многие «сигнальные» липиды обычно являются продуктами ферментативного расщепления или превращения «структурных» липидов плазматической мембраны или образуются в ходе метаболических превращений, то есть процессы метаболизма липидов и их сигнальные функции тесно связаны. Более того, выраженная компартментализация отдельных этапов метаболизма липидов между разными типами клеток нервной системы ещё более осложняет разграничение метаболических и сигнальных/регуляторных функций липидов.

Несмотря на возросший интерес к данной теме и её актуальность, в литературе всё ещё мало экспериментальных данных о потенциальных перекрёстных взаимодействиях в области метаболизма липидов между клетками ЦНС. Такая коммуникация с участием липидов и их метаболитов может служить ещё одним примером того, как глиальные клетки регулируют деятельность нейрона.

Цель данной работы — охарактеризовать вклад липидов различных глиальных клеток (астроцитов, олигодендроцитов, микроглии) в регуляцию деятельности нейронов. В отличие от ряда обзоров по сходной тематике, в этой статье мы попытались дополнительно учесть компартментализацию отдельных этапов метаболизма липидов и работу многочисленных систем, обеспечивающих трафик липидов и их производных.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АСТРОЦИТОВ С НЕЙРОНАМИ И ДРУГИМИ КЛЕТКАМИ ЦНС

Функции астроцитов. Астроциты, наиболее хорошо изученные специализированные глиальные клетки, являются, по мнению многих авторов, преобладающим типом во взрослом мозге [5], хотя ряд исследователей указывает, что соотношение нейронов и астроцитов может сильно отличаться в различных структурах мозга [6].

Астроциты выполняют многочисленные функции в головном мозге, включая регуляцию целостности гематоэнцефалического барьера [7], внеклеточной концентрации нейротрансмиттеров (особенно глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК)) [8], гомеостаза воды и ионов [9, 10], а также метаболическую и трофическую поддержку нейронов, которая реализуется при контакте между эндотелиальными клетками, астроцитами и нейронами [11, 12]. Взаимодействие нейрон–астроцит существенно не только для функционирования зрелого мозга [13, 14], но и имеет большое значение для развивающегося мозга, когда астроциты оказывают влияние на рост и развитие нейронов, образование синаптических контактов [12, 15, 16]. В последние годы появляется всё больше данных, подтверждающих, что астроциты играют непосредственную роль в обработке информации в ЦНС. Это привело к появлению понятий «трёхстороннего синапса» (tripartite synapse) и «глиотрансмиссии» [17]. Трёхсторонний синапс служит ярким примером межклеточной интеграции в ЦНС и представляет собой структуру, где отростки астроцитов активно взаимодействуют с пре- и постсинаптическими нейронами в области синапса. В настоящее время такая кооперация установлена для глутаматных, ГАМК и ацетилхолиновых синапсов, однако достоверных подтверждений её существования в дофаминергической и серотонинергической системах пока не найдено. Высвобождение нейротрансмиттеров из пресинаптического окончания активирует метаболитные рецепторы на астроцитах, которые реагируют повышением уровня внутриклеточного кальция. Это, в свою очередь, стимулирует высвобождение химических медиаторов (например, глутамата, ГАМК, АТР, D-серина), названных «глиотрансмиттерами», посредством различных механизмов, которые до сих пор остаются предметом дискуссий [18, 19]. Глиотрансмиттеры могут стимулировать или подавлять синаптическую передачу в зависимости от типа медиатора [20–22]. Помимо глиотранс-

миттеров, астроциты способны высвобождать множество факторов, влияющих на нейроны, в том числе большие везикулы, содержащие функционирующие митохондрии и липидные капли, электронно-плотные везикулы, содержащие нейропептид Y и другие нейропептиды, осуществлять транспорт глюкозы и лактата, а также выделять другие сигнальные молекулы [23, 24]. В совокупности весь массив таких данных послужил обоснованием концепции «активной среды» (*active milieu*) [25], когда в эту интеграцию включены другие глиальные клетки, сосуды и внеклеточное пространство.

Таким образом, функциональная взаимосвязь между астроцитами и нейронами, а также другими клетками является строго регулируемым процессом и имеет решающее значение для поддержания нормальной работы мозга. В данном разделе мы подробнее остановимся на тех соединениях липидной природы, которые могут участвовать в реализации различных механизмов нейропластичности, особенно синаптической пластичности.

Роль астроцитарных липидов в межклеточных взаимодействиях. Липиды — не только структурные компоненты клеток ЦНС, но и важнейшие соединения, обеспечивающие функциональную активность нейронов. Содержание липидов в мозге является одним из самых высоких среди всех органов и тканей, за исключением жировой ткани [26]. Особенности состава липидов (количество представителей основных классов липидов и их соотношение) и их функциональная роль в нейронах обсуждались нами ранее [4, 27]. Гораздо меньше известно о функциях липидов в самих астроцитах, однако за последние годы интерес к этой теме значительно вырос [24, 28].

Как уже упоминалось выше, астроциты оказывают влияние на рост и ветвление нейритов, а также на образование синапсов, то есть на процессы, непосредственно вовлечённые в реализацию феномена синаптической пластичности. Такое влияние может осуществляться за счёт секреции астроцитами различных сигнальных молекул [23], в том числе липидной природы, синтезируемых этими глиальными клетками. Ярким примером сигнальных функций липидов является фосфатидная кислота (ФК), образующаяся в астроцитах в основном при действии фосфолипазы D1. Нокдаун гена этого фермента в астроцитах снижал ветвление дендритов в смешанной культуре клеток гиппокампа [29]. Кроме того, нарушение роста нейритов при болезни Альцгеймера также ассоциируется с дисфункцией фосфолипазы D1 [30].

Внутриклеточное образование ФК может регулироваться несколькими ферментами: фосфолипазой D (гидролиз мембранных фосфолипидов), дилицеролкиназой (фосфорилирование диацилглицерола), ацилтрансферазой (присоединение жирной кислоты к лизофосфатидату), а также при участии ферментов биосинтеза фосфолипидов *de novo*. Дефекты различных ферментов, участвующих в образовании ФК, приводят к развитию многих нейропатологий, что подтверждает важную роль ФК как регуляторного фактора [31]. В экспериментах на мышах с нокаутом гена *Fmr1*, связанным с торможением экспрессии дилицеролкиназы, обнаружено изменение соотношения уровней диацилглицерола и ФК в нейронах [32]. Следствием этого дисбаланса может быть нарушение передачи сигналов от ФК, необходимых для созревания дендритных шипиков, в частности сигналов, стимулирующих полимеризацию актина, необходимую для стабилизации структуры шипика.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что фосфолипаза D и дилицеролкиназа (ДГК), подвергающиеся сложной и жёсткой регуляции, являются двумя основными ферментами, участвующими в образовании ФК, используемой для сигнальных процессов [33–35]. Например, было показано, что среди 10 известных изоформ дилицеролкиназ 6 участвуют в некоторых формах синаптической пластичности [34–36]. Так, ДГКβ может быть вовлечена в процессы роста дендритов и синаптогенеза в клетках гиппокампа [37], ДГКβ и ДГКξ, расположенные в области постсинаптической плотности, участвуют в формировании долговременной потенциации, лежащей в основе памяти и обучения [38, 39]. Кроме того, ДГКα является уникальной изоформой ДГК из-за её экспрессии в глиальных клетках — этот фермент локализуется в олигодендроцитах [40].

Механизмы, посредством которых реализуются биологические эффекты ФК, могут быть различны и до сих пор интенсивно изучаются. Прежде всего, благодаря конусообразной пространственной конфигурации молекулы ФК способствует искривлению мембраны и изменению её структуры, что необходимо как для слияния везикул, так и для взаимодействия с мембраной некоторых растворимых белков. Например, ФК связывается с белком синтаксин-1A в комплексе SNARE [41]. Кроме того, ФК может действовать как мессенджер, напрямую взаимодействуя со специфическими лигандами [42]. При связывании ФК с белком возможно изменение каталитической

активности фермента или присоединение белка к мембране. Был идентифицирован ряд мишеней ФК, включающих белки, участвующие в фосфорилировании и дефосфорилировании белков и липидов, в регуляции рецепторов, связанных с G-белками, а также в везикулярном транспорте и метаболизме [43–45]. Не стоит забывать, что ФК является ключевым промежуточным соединением при биосинтезе фосфолипидов и источником других сигнальных молекул, таких как диацилглицерол, лизофосфатидная кислота, свободные жирные кислоты, фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PI4,5P₂). Всё это делает ФК жизненно важным регулятором нейротрансмиссии и синаптической пластичности. По всей видимости, немаловажное значение имеет также, какой именно молекулярный вид ФК образуется [46].

Взаимодействуя с различными белками (киназами, фосфатазами, фосфолипазами, G-белками и др.), ФК может регулировать такие процессы, как пролиферация клеток, транспорт везикул, организация цитоскелета и, таким образом, играть существенную роль в развитии нейронов. Механизм действия внеклеточной ФК в данном случае может быть опосредован рецепторами, связанными с G-белками и дальнейшей активацией протеинкиназы А и соответствующих сигнальных путей в нейронах [29] (рис. 2).

Среди сигнальных молекул липидной природы, выделяемых астроцитами, также необходимо упомянуть сфингозин-1-фосфат, эйкозаноиды, холестерин [22]. Эйкозаноиды, образующиеся из арахидоновой кислоты (в частности простагландины), служат важными медиаторами в ЦНС. Они могут участвовать в регуляции синаптической передачи, воспалительных реакций, в контроле скорости кровотока в мозге [47–49]. Так, высвобождение глутамата из нейронов, помимо передачи межнейронального сигнала, также приводит к активации астроцитарных метаболитных рецепторов глутамата, сопровождающейся повышением уровня внутриклеточного Ca²⁺ и стимуляцией фосфолипазы А₂, что ведёт к образованию свободной арахидоновой кислоты (АК) (рис. 2) [50]. Увеличение количества АК стимулирует, в свою очередь, образование её метаболитов, которые оказывают вазодилатирующий эффект на близлежащие артериолы. Простагландин Е₂ обеспечивает расширение артериол путём связывания с рецептором на гладкомышечных клетках стенки артериол. Эпоксэйкозатриеновая кислота тоже может вызывать расширение сосудов, но уже посредством ингибирования рецепторов тромбоксана,

вазоконстриктирующего метаболита АК [19]. В некоторых исследованиях на переживающих срезах мозга и изолированной сетчатке увеличение уровня внутриклеточного Ca²⁺ в астроцитах также приводило к вазоконстрикции. Оказалось, что этот эффект связан с окислением арахидоната до 20-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты (20-НЕТЕ) в гладкомышечных клетках сосудов [50, 51]. Таким образом, регуляция кровоснабжения мозга метаболитами АК, выделяющимися из астроцитов, является ещё одним механизмом, связанным с пластичностью мозга.

Астроциты принимают участие в работе эндоканнабиноидной системы в головном мозге. Эти глиальные клетки имеют каннабиноидные рецепторы типа CB₁R, которые связывают анандамид и 2-арахидоноилглицерин (эндогенные лиганды, образующиеся из N-ацилфосфатидилэтаноламина и диацилглицерола соответственно), выделяемые постсинаптическими нейронами. Активация рецепторов CB₁R приводит к Ca²⁺-зависимому высвобождению глутамата астроцитами в области трёхстороннего синапса [52] (рис. 2). Особо следует подчеркнуть, что высвобождение глиотрансмиттеров (глутамата, АТР и др.) может происходить не только в области трёхстороннего синапса, но и в дистальных участках астроцита, удалённых от источника эндоканнабиноидов, регулируя, таким образом, активность синапсов других нейронов. Следовательно, с помощью такого механизма передачи каннабиноидного сигнала астроциты могут вызывать как временные регуляторные эффекты, так и контролировать длительные изменения в нескольких синапсах, что важно для процессов синаптической пластичности [53]. Высказываются предположения о взаимосвязи эндоканнабиноидной и эйкозаноидной сигнальных систем, поскольку их метаболические пути (биосинтез при участии АК, пути окисления при участии циклооксигеназы и липоксигеназы, взаимные превращения) тесно переплетаются [54]. По нашему мнению, эти исследования находятся только в самом начале, и многое ещё предстоит выяснить.

Хорошо известно, что астроциты обеспечивают метаболическую поддержку нейронов. Поскольку нейроны имеют самую высокую потребность в энергии и обычно не содержат значительного пула глюкозы, гликогена или липидных капель, то в условиях высокой активности энергетические субстраты должны поступать в эти клетки извне. Считается, что астроциты участвуют в поглощении и распределении многих соединений головного

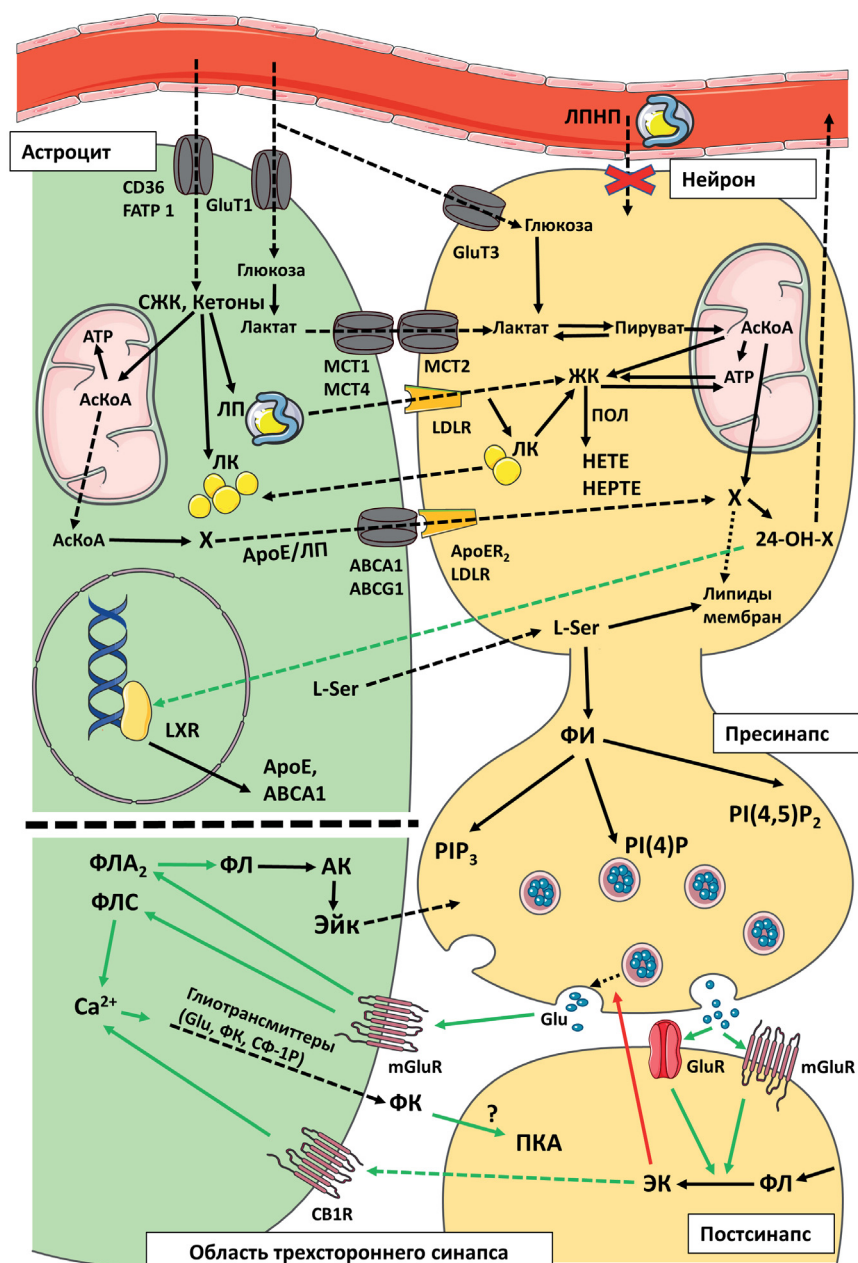


Рис. 2. Схема участия липидов и их метаболитов во взаимодействии астроцит–нейрон, в том числе в области трёхстороннего синапса. Показан метаболизм и транспорт метаболитов липидов между различными частями астроцита и нейрона. Сплошными стрелками показаны пути превращения соединений, пунктирными – пути транспорта соединений; зелёные стрелки – активирующие пути, красные – ингибирующие пути. Шаблоны, использованные для создания рисунка, находятся в свободном доступе на сайте Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>). Сокращения: АК – арахидоновая кислота; ЖК – жирные кислоты; ЛК – липидные капли; ЛП – липопротеины; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ПК – протеинкиназа А; СЖК – свободные жирные кислоты; СФ-1-Р – сфингозин-1-фосфат; ФИ – фосфоинозитиды (в том числе PI(4)P, PI(4,5)P₂, PIP₃); ФК – фосфатидная кислота; ФЛ – фосфолипиды; ФЛА2 – фосфолипаза А2; ФЛС – фосфолипаза С; Х – холестерин; 24-ОН-Х – 24-гидроксихолестерин; ЭК – эндоканнабиноиды; ABCA, ABCG – транспортеры, члены семейства ATP-binding cassette transporter; ApoE – аполипопротеин Е; СВ1R – рецептор каннабиноидов, тип 1; CD36 – транспортер жирных кислот; FATP – белок, транспортирующий жирные кислоты; Glu – глутамат; GluR – ионотропные рецепторы глутамата (NMDA, AMPA); GLUT – транспортер глюкозы; НЕРТЕ – гидроперокситетраеновые кислоты; НЕТЕ – гидроксизетраеновые кислоты; LDL-R – рецептор ЛП низкой плотности; LXR – X-рецептор печени, транскрипционный фактор; MCT – транспортеры монокарбоновых кислот; mGluR – метаботропные рецепторы глутамата

мозга [55, 56]. Интересно, что L-серин синтезируется и высвобождается во внеклеточное пространство только астроцитами, а также сходными с ними клетками радиальной глии.

Нейроны, не способные к синтезу этого соединения, используют астроцитарный L-серин для биосинтеза таких липидов, как фосфатидилсерин и гликофинголипиды [57].

В астроцитах более интенсивно, чем в нейронах, протекает метаболизм липидов [58, 59]. Такие процессы, как β -окисление жирных кислот и кетогенез, осуществляются в основном в астроцитах, а образующиеся в результате метаболиты (ацетил-CoA, NADH, FADH₂, кетоны) поступают в нейроны для последующего синтеза АТФ [60–62]. Низкий уровень β -окисления в нейронах связан с невысокой скоростью переноса длинноцепочечных CoA-производных жирных кислот через внутреннюю митохондриальную мембрану и низкой активностью самих ферментов β -окисления [61]. Предполагается, что процесс окисления жирных кислот может сопровождаться возникновением окислительного стресса [62]. Периодам интенсивной нейрональной активности также сопутствует повышение уровня активных форм кислорода, накопление гидроперекисей жирных кислот и развитие окислительного стресса, к которому нейроны очень чувствительны. Защита нейронов от токсического действия гидроперекисей, т.е. нейропротекторная функция, осуществляется астроцитами, которые аккумулируют окисленные жирные кислоты в своих липидных каплях [63, 64]. Их транспорт происходит с участием аполипопротеин-содержащих липопротеинов (рис. 2). Липидные капли в астроцитах, помимо гидроперекисей жирных кислот, содержат большой пул липидов, необходимый для обеспечения нейронов энергией. Предполагается, что в периоды интенсивной активности или длительного стресса нейроны могут индуцировать образование липидных капель в соседних астроцитах [65]. В то же время стоит подчеркнуть, что в норме в клетках головного мозга взрослых животных липидные капли присутствуют в очень незначительных количествах, однако их накопление, в основном в астроцитах и микроглии, наблюдается в ходе развития мозга, при старении и при некоторых патологических состояниях, таких как нейродегенеративные заболевания [64, 66].

Астроциты интенсивно синтезируют и секретируют молекулы различных липидов, включая стеролы, жирные кислоты и триглицериды; синтезируют глицеро- и сфинголипиды [59, 67–69]. Важно, что именно астроциты являются основным источником в ЦНС докозагексаеновой и арахидоновой кислот, которые образуются в этих клетках путём удлинения незаменимых жирных кислот, поступающих через гематоэнцефалический барьер [70].

Достаточно много работ посвящено изучению метаболизма холестерина в астро-

цитах [71–73]. Содержание этого липида необычайно высоко в головном мозге, при этом максимальное его количество обнаружено в миелине, о чём речь пойдёт ниже [74].

Астроциты — основные клетки взрослого мозга, которые синтезируют холестерин и поставляют его в нейроны в составе липопротеинов [68, 71]. Будучи важным структурным компонентом липидного бислоя, этот липид активно используется нейронами для формирования мембран в ходе синаптогенеза как в развивающемся, так и во взрослом мозге, и в больших концентрациях присутствует в синаптических пузырьках [75, 76]. Эти факты позволяют рассматривать холестерин как астроцитарный фактор, способствующий синаптогенезу.

Интересно отметить, что астроциты и нейроны используют разные постскаваленовые этапы биосинтеза холестерина [68], в ходе которых, помимо холестерина, образуются разные промежуточные метаболиты, обладающие разной биологической активностью [77]. В частности, в астроцитах такие промежуточные метаболиты используются в синтезе нейростероидных гормонов [78].

Биосинтез холестерина и жирных кислот в клетках находится под контролем семейства транскрипционных факторов SREBP (sterol regulatory element binding protein), которые регулируют синтез белков, участвующих в метаболизме этих липидов [79]. Снижение активности SREBP в астроцитах мутантных мышей (за счёт инактивации гена, кодирующего белок SCAP (SREBP cleavage-activating protein — активатора SREBP)) приводило к замедлению секреции холестерина и фосфолипидов этими клетками, что сопровождалось нарушением функций пресинаптических структур ближайших нейронов *in vivo* [59]. Это неудивительно, поскольку известно, что холестерин связывается с синаптофизинном при образовании синаптических пузырьков в пресинапсе [80, 81]. Кроме того, холестерин является важным компонентом липидных рафтов, присутствие его необходимо для кластеризации и обеспечения стабильности рецепторов нейромедиаторов, ростовых факторов и других биологически активных соединений в постсинаптической мембране, что, несомненно, является важным фактором, обеспечивающим феномен синаптической пластичности [81–83].

Как мы видим, транспорт липидов имеет большое значение для нейроглиальных взаимодействий. Многочисленные исследования, проведённые за последние годы, демонстрируют роль этих процессов как в ходе развития

нервной системы, так и в поддержании когнитивных функций мозга во взрослом состоянии. Процессы транспорта липидных молекул осуществляются разнообразными межклеточными и внутриклеточными переносчиками [84]. Нейроны и астроциты взрослого мозга экспрессируют несколько мембранных переносчиков жирных кислот, таких как FATP1 (fatty acid transport protein), FATP4, CD36(FAT), а астроциты и клетки-предшественники олигодендроцитов — ещё и FABP7 [64, 85, 86]. FABP (fatty acid binding proteins) контролируют поступление и внутриклеточное распределение жирных кислот, а следовательно, участвуют в метаболизме липидов, трансдукции сигналов и регуляции активности генов. Синтез FABP7 в мозге взрослых животных необходим для регуляции работы астроцитарных рафтов (через изменение экспрессии кавеолина-1) и ответа на внешние стимулы этими глиальными клетками, что, в свою очередь, обеспечивает нормальное функционирование нейронов [87]. Было показано, что дефицит FABP7 у мышей с нокаутом гена *Fabp7* приводит к изменению морфологии дендритных шипиков и снижению количества возбуждающих синапсов [88]. Стимулируемый астроцитарным лактатом биосинтез жирных кислот в нейронах сопровождается их последующим транспортом в астроциты при участии FATP1 или FATP4 и запасанием в липидных каплях [89]. Эти транспортёры также участвуют в переносе синтезированных жирных кислот (например, ключевых докозагексаеновой и арахидоновой) из астроцитов, что в дальнейшем стимулирует их использование для включения в фосфолипиды нейрональных мембран [64].

В транспорте липидов в головном мозге участвуют липопротеины (ЛП). ЛП, циркулирующие в кровяном русле, не способны проникать через гематоэнцефалический барьер, за исключением липопротеинов высокой плотности, таким образом, они должны вырабатываться непосредственно в клетках центральной нервной системы. Считается, что астроциты являются основным местом синтеза и сборки собственных ЛП в головном мозге [90]. К наиболее распространённым аполипопротеинам (Апо) в составе ЛП нервной ткани относятся АпоЕ и АпоJ. АпоЕ участвует в транспорте жирных кислот и холестерина из астроцитов в нейроны, связываясь с представителями семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности или рецептором аполипопротеина Е2 (АпоЕР2) [58, 89]. Нокаут генов этих рецепторов у мышей приводит к снижению количества синапсов и нарушению про-

цессов обучения и памяти [91, 92]. Интересно, что усиленная экспрессия гена *АпоЕ4*, по-видимому, связана с повышенным риском возникновения болезни Альцгеймера, поскольку обнаружено, что АпоЕ4 может связываться с β -амилоидным пептидом, способствуя образованию фибриллярных структур [93–95]. Важную роль в транспорте липидов и нейроглиальных взаимодействиях играет также белок АпоD [96].

Если транспорт липидов из астроцитов в нейроны может осуществляться как аполипопротеинами, так и в составе ЛП, то нейроны выводят избыток холестерина с помощью ЛП, превращая его в 24(S)-гидроксистерин [58]. Эта реакция катализируется холестерин-24(S)-гидроксилазой (CYP46A1), которая экспрессируется исключительно в нейронах [97]. Нейроны и астроциты синтезируют также разные мембранные переносчики холестерина, регулирующие его отток из клеток: в астроцитах преобладают ABCA1 и ABCG1, а в нейронах — ABCG4 [58].

Таким образом, не только образующиеся в астроцитах сигнальные молекулы липидов или их производных, но и процессы метаболизма и транспорта липидов играют существенную роль во взаимодействии астроцитов и нейронов, о чём свидетельствует развитие целого ряда патологий ЦНС при нарушении этих процессов [26, 98, 99].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОЛИГОДЕНДРОЦИТОВ С НЕЙРОНАМИ

Функции олигодендроцитов. Миелинизирующие клетки глии — олигодендроциты (ОЛ) и шванновские клетки также чрезвычайно важны для поддержания взаимосвязи клеток и их функционирования в нервной системе. Олигодендроциты — это разветвлённые крупные глиальные клетки, которые образуют специфическую многослойную липидно-белковую структуру — миелиновую оболочку вокруг аксона. Один олигодендроцит способен миелинизировать до 50–60 сегментов аксонов. Миелиновая оболочка не только обеспечивает быстрое скачкообразное проведение импульсов по аксону, но и выполняет трофическую функцию, поддерживая целостность и выживание аксона, что необходимо для реализации феномена нейропластичности [100].

Помимо зрелых ОЛ, в последнее время выделяют отдельную популяцию клеток-предшественников олигодендроцитов — NG2-глию, составляющую около 5% от общего количества

глиальных клеток. Эта популяция глиальных клеток сохраняется в ЦНС взрослых животных и продолжает генерировать зрелые миелинизирующие ОЛ на протяжении всей жизни, однако их функции во взрослом мозге ещё выяснены не до конца [2, 101]. Наиболее интересным фактом является то, что эти клетки способны образовывать функциональные синапсы с нейронами [102].

Олигодендроциты и NG2-клетки экспрессируют потенциал-зависимые ионные каналы (Nav, Kv, Cav) и различные рецепторы нейромедиаторов. Ключевой особенностью является присутствие калиевых каналов, среди которых особое значение имеет преобладающий подтип — обращённые K^+ -каналы (Kir4.1) [103]. Нейромедиаторы и K^+ , высвобождаемые синаптическими окончаниями аксонов, действуют на ионные каналы и рецепторы ОЛ, таким образом, нейроны могут оказывать влияние на процесс миелинизации. Активность и количество ионных каналов и рецепторов меняется как во время развития, регулируя процессы миелинизации, так и при патологических (демиелинизирующих) состояниях [101, 104].

Помимо образования миелина, ОЛ секретируют различные факторы, осуществляя, наряду с астроцитами, метаболическую поддержку нейронов и участвуя в стабилизации цитоскелета аксонов. Олигодендроциты поставляют лактат, который транспортируется через переносчик MCT1 в периаksonальное пространство, откуда он поглощается аксонами с участием MCT2 [101]. Такое дополнительное поступление энергетического субстрата способствует бесперебойной работе Na^+/K^+ -АТФазы для восстановления ионной асимметрии в области перехватов Ранвье.

Роль липидов олигодендроцитов в межклеточных взаимодействиях. Уникальной характеристикой, которая отличает миелин от других биологических мембран, является необычайно высокое содержание липидов, которое доходит до 70–80% от сухого веса миелина. Согласно недавним исследованиям, липидом миелина ЦНС человека насчитывает около 700 различных представителей липидов [105], структура и соотношение которых меняются в процессе развития головного мозга [106].

Дифференцировка и созревание ОЛ сопровождаются повышенной экспрессией ферментов синтеза липидов. Считается, что к окончанию периода миелинизации ОЛ синтезируют около 40% от общего количества липидов в мозге человека. Основные классы липидов зрелого (компактного) миелина — холестерин, глицерофосфолипиды и гликофинголипиды, присут-

ствуют в довольно постоянном соотношении (около 2/2/1). Всего идентифицировано около 20 классов липидов, при этом преобладающими являются холестерин, галактозилцерамиды и этаноламинплазмалогены. В миелине присутствуют уникальные молекулярные виды липидов, которых нет в соседних нейрональных или глиальных клетках, что обеспечивает плотность упаковки этих мембран. В целом липиды миелина содержат меньше полиненасыщенных жирных кислот и больше представителей, имеющих очень длинные ацильные цепи [105, 107]. Качественные и/или количественные изменения соотношений молекулярных видов или классов липидов всегда связаны с дисфункцией миелина.

Относительно недавно было высказано предположение, что жирные кислоты с очень длинной цепью (ДЦЖК) могут окисляться в пероксисомах, расположенных в отростках олигодендроцитов, примыкающих к аксонам (адаксональный слой миелина). Образовавшиеся укороченные жирные кислоты могут транспортироваться в аксоны и использоваться как субстраты для митохондриального β -окисления [108]. Таким образом, ОЛ, наряду с астроцитами, могут обеспечивать аксоны субстратами для получения энергии или сигнальными молекулами. С другой стороны, метаболиты, образующиеся в аксонах, могут поддерживать процессы миелинизации в ОЛ. Так, N-ацетил-аспартат (NAc-Asp), образующийся в аксональных митохондриях, транспортируется в ОЛ и там расщепляется аспартатацилазой до ацетата и аспартата [109]. Эти соединения могут использоваться как непосредственно для синтеза липидов (ацетат), так и опосредовать увеличение экспрессии генов (аспартат через ряд промежуточных метаболитов), участвующих в синтезе сульфатидов и сфингомиелина (рис. 3).

Одним из наиболее изученных липидов, в связи с его ролью в формировании миелина, является холестерин. На долю этого липида в миелине мозга взрослых животных приходится до 80% от общего липидного состава, а доступность холестерина определяет скорость и своевременность миелинизации. Скорость биосинтеза холестерина *de novo* в олигодендроцитах максимальна именно в период интенсивной миелинизации [81, 110, 111]. Отсутствие синтеза холестерина в ОЛ у мышей с нокаутами генов ферментов этого процесса (скваленсинтазы, 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА синтазы I) приводит к отсроченному началу миелинизации [110, 112]. Кроме того, определённую роль в формировании пула

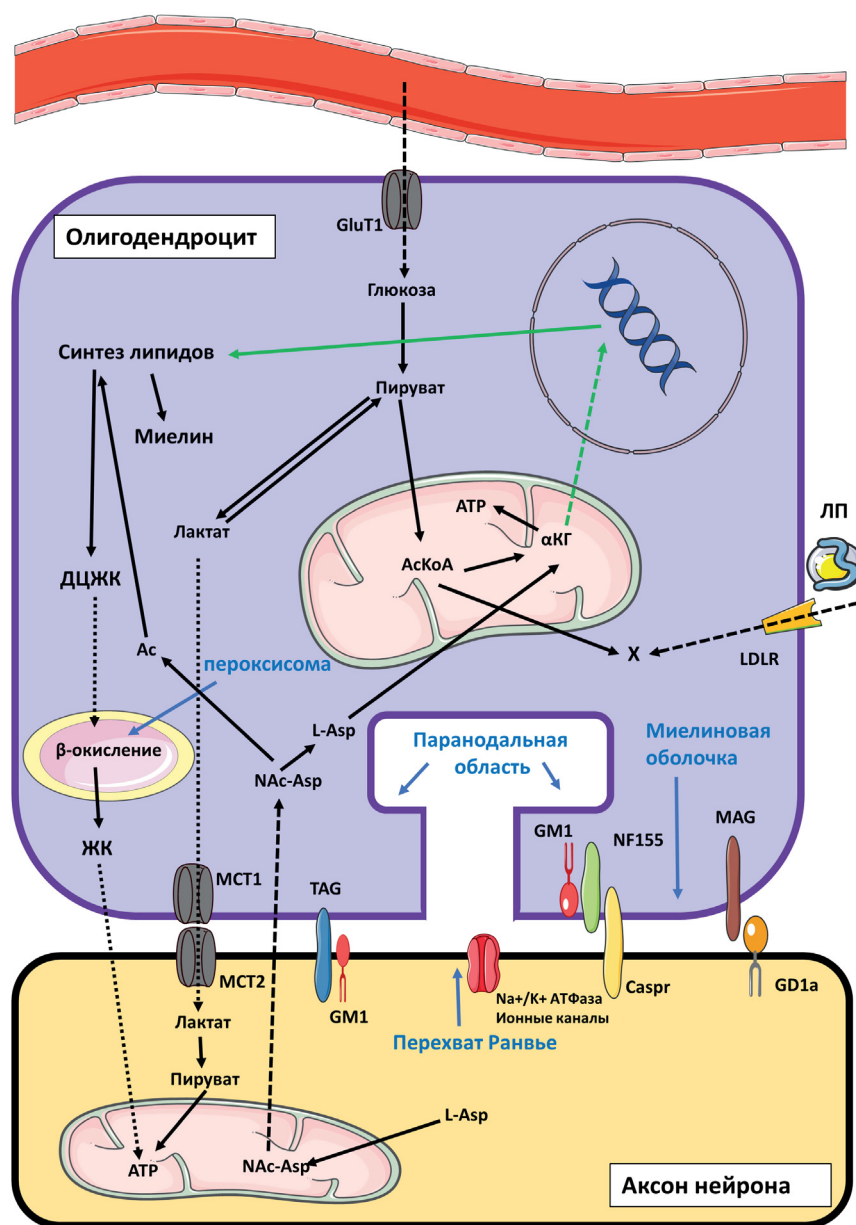


Рис. 3. Схема участия липидов и их метаболитов во взаимодействии олигодендроцит–нейрон, в том числе в стабилизации миелинового слоя (адаксональный слой миелина). Сплошными стрелками показаны пути превращения соединений, пунктирными — пути транспорта соединений; зелёные стрелки — активирующие пути. Шаблоны, использованные для создания рисунка, находятся в свободном доступе на сайте Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>). Сокращения: ДЦЖК — длинноцепочечные жирные кислоты; ЖК — жирные кислоты; αКГ — альфа-кетоглутарат; ЛП — липопротеины; Х — холестерин; Ас — ацетил; GLUT — транспортёр глюкозы; GM1, GD1a — ганглиозиды; LDL-R — рецептор ЛП низкой плотности; MAG — миелин-ассоциированный гликопротеин; MCT — монокарбоновые транспортёры; NAc-Asp — N-ацетил-аспартат; белки клеточной адгезии: TAG (Transient Axonal Glycoprotein), NF155 (Neurofascin), Caspr (Contactin-associated protein)

холестерина ОЛ в процессе миелинизации могут играть астроциты, поставляя холестерин в составе ЛП [113]. Важным участником внутриклеточного транспорта холестерина, посредством которого он мобилизуется из ЛП в эндолизосомальной системе, является трансмембранный белок Нимана–Пика С1 (Npc1). Делеция гена Npc1 как в нейронах, так и в олигодендроцитах приводит к нарушению об-

разования миелина и даже остановке созревания олигодендроцитов [114].

Влияя на жидкость мембраны и взаимодействуя с белками, холестерин способствует сборке миелина и более плотной упаковке липидов в этой мембранной структуре. Холестерин необходим не только для формирования миелиновых мембран, но и, возможно, участвует в передаче сигнала внутрь олигодендро-

цита, активируя сигнальные пути, стимулирующие процесс миелинизации. Составляя основу рафтов, холестерин может обеспечивать сборку белковых комплексов в этих микродоменах. В экспериментах на рыбках *Danio* было показано, что присутствие холестерина облегчает передачу сигналов, опосредованную сигнальным каскадом PI3K/Akt/mTOR (одним из основных факторов миелинизации) в клетках-предшественниках олигодендроцитов. Поскольку киназа mTOR также контролирует экспрессию генов, необходимых для синтеза холестерина, то этот факт может указывать на существование петли положительной обратной связи, регулирующей процесс миелинизации [115].

Таким образом, липиды являются не только важными структурными компонентами миелиновых мембран, они также определяют локализацию белков в клеточной мембране ОЛ, влияя на их функции. Ключевая роль липидов в липид-белковых взаимодействиях наиболее ярко проявляется в период начала интенсивной миелинизации, когда растущий ОЛ должен вступить в контакт с аксоном. При этом в процессах межклеточной адгезии и узнавания основная роль среди липидов отводится ганглиозидам и сульфocereброзидам [24, 116, 117]. Установлено, что ганглиозид GM1, расположенный в паранодальных областях миелиновой оболочки, имеет решающее значение для взаимодействия глиального белка нейрофасцина-155 (NF155) и аксонального комплекса контактин/Caspr1 (контактин-ассоциированный белок 1) (рис. 3). Это белки клеточной адгезии, взаимодействие которых необходимо для сохранения цитоархитектоники паранодальных регионов. У мутантных мышей с нарушением синтеза GM1 или сульфocereброзидов наблюдается снижение уровня Caspr и NF155 в рафтах, а также изменение количества и локализации ионных каналов в паранодальных областях около перехватов Ранье [118, 119].

Со своей стороны, ганглиозиды нейронов, в частности GM1, GD1a и GT1b, также участвуют в стабилизации миелиновых мембран. GD1a и GT1b, два наиболее распространённых ганглиозида аксональных мембран, взаимодействуют с миелин-ассоциированным гликопротеином (MAG), являясь его рецепторами [120–122]. Передача сигналов между ганглиозидами аксона и иммуноглобулиновыми доменами MAG с участием Fak1-киназы определяет расстояние между аксоном и самой внутренней (адаксональной) мембраной миелина, контролирует образование миелина, а также ингибирует рост нейритов в развивающемся мозге или регенерацию аксона во взрослом мозге [122].

По всей видимости, ганглиозиды GM3, GM1, GD1b и GD3 могут модулировать расположение в мембранном рафте другой молекулы адгезии, TAG-1 (transient-axonal glycoprotein 1), которая экспрессируется как в нейронах, так и в олигодендроцитах [123, 124]. Этот белок в основном находится в юкстапаранодальных областях, где необходим для правильной локализации и компартментализации калиевых каналов (в частности Kv1.1/1.2). Однако особенности взаимодействия этой молекулы адгезии с ганглиозидами и его участия в стабилизации миелина ещё предстоит изучить.

Нарушения синтеза гликолипидов, играющих важную роль в формировании и поддержании структуры миелина, приводит к развитию различных демиелинизирующих заболеваний [117].

Таким образом, рассмотренные данные, подтверждая значимость олигодендроцитарных липидов в обеспечении функциональной активности ЦНС, указывают на перспективность дальнейших исследований этих сложных аспектов межклеточной коммуникации.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С НЕЙРОНАМИ

Функции микроглии. Ещё один тип глиальных клеток — микроглия — составляет около 10–15% от популяции клеток головного мозга взрослых животных и представляет собой фагоцитирующие и иммунокомпетентные клетки нервной системы, функционально отличные от аналогичных клеток периферических тканей. На ранних стадиях развития в мозге присутствует множество различных субпопуляций микроглии, однако с возрастом эта гетерогенность снижается [125]. Эти клетки играют важную роль в развитии ЦНС и поддерживают гомеостаз как в развивающемся, так и во взрослом мозге. В функции микроглиальных клеток входит удаление апоптотических и некротических клеток, несвёрнутых белков (например β -амилоида), а также миелинового дебриса. На ранних этапах развития мозга микроглия поддерживает выживание нейронов и ОЛ, способствует апоптотической гибели избыточных нейронов-предшественников и дифференцировке клеток-предшественников ОЛ. В постнатальный период эти клетки участвуют в поддержании пула клеток-предшественников ОЛ, созревании синапсов и ремоделировании нейронных сетей, таким образом, активно участвуя в процессах, обеспечивающих пластичность мозга.

Являясь важной частью врождённой иммунной системы, клетки микроглии активируются при различного рода воспалительных процессах в ЦНС, что является характерным признаком нейровоспаления и нейродегенерации [126, 127]. Таким образом, микроглиальные клетки могут взаимодействовать с нейронами, астроцитами и олигодендроцитами, оказывая влияние на их функционирование. Медиаторами такого взаимодействия служат внеклеточные везикулы и липопротеины [128, 129]. Нарушение взаимодействия между нейронами и микроглией оказывает негативное действие на функции ЦНС, включая память и некоторые типы поведения [130].

Роль липидов микроглии в межклеточных взаимодействиях. В литературе накоплен большой массив данных об участии про- и противовоспалительных факторов, хемокинов и других соединений, выделяемых микроглией, в межклеточных взаимоотношениях в ЦНС. Значительно меньше сведений о липидах микроглии и об их возможной роли во взаимодействии этих клеток с нейронами, астроцитами и олигодендроцитами. В последние годы эти вопросы всё больше стали привлекать внимание, такие исследования весьма интересны и перспективны. Однако точная роль липидов микроглии и конкретные механизмы всё ещё остаются мало изученными.

Важно отметить, что клетки микроглии могут как сами синтезировать липиды, так и получать их извне (транспорт при участии ApoE и ApoJ) и накапливать [127, 129, 131]. Липидный состав микроглии характеризуется высоким содержанием сфинголипидов, в частности сфингомиелинов, с преобладанием молекулярных видов, которые не встречаются в других клетках ЦНС [26]. В публикациях появляются данные, указывающие на то, что процессы метаболизма липидов в клетках микроглии участвуют в активации этих клеток, вызывая миграцию, фагоцитоз и запуск воспалительных реакций и, таким образом, опосредованно влияя на функции нейронов и других глиальных клеток [131, 132]. Кроме того, скорость метаболизма липидов изменяется в процессе развития клеток микроглии и при переходе из одного состояния в другое — для взрослой микроглии [125, 131, 133].

Традиционно ключевая роль микроглии отводится фагоцитозу богатого липидами миелинового дебриса или олигодендроцитов, находящихся в стадии апоптоза (рис. 1). При нейровоспалительных заболеваниях разрушение миелиновых оболочек приводит к накоплению остатков миелина, что стимулирует

запуск фагоцитоза клетками микроглии [134]. Поглощение фрагментов миелина опосредуется появлением на поверхности микроглиальных клеток основного фагоцитарного рецептора CD36 (транслоказа жирных кислот), в свою очередь, поступление миелина увеличивает экспрессию CD36, усиливая дальнейший захват миелинового дебриса [135]. С одной стороны, поглощение миелина, содержащего большое количество холестерина, требует его элиминации, поскольку накопление этого липида и продуктов его метаболизма способствуют нейровоспалению [127, 136]. С другой стороны, холестерин является также биологически активным соединением, которое способствует выживанию микроглиальных клеток в культуре и поставляется из астроцитов [133]. Установлено, что в условиях демиелинизации микроглия начинает синтезировать десмо-стерол, непосредственный предшественник в биосинтезе холестерина и агонист X-рецепторов печени (LXR), тем самым способствуя ремиелинизации [137]. В целом, баланс между поступлением холестерина и его оттоком может играть важную роль в функционировании этих глиальных клеток и представлять собой ещё один вариант проявления нейропластичности, а также играть роль в развитии нейровоспалительных заболеваний.

Одной из особенностей микроглии является её высокая чувствительность к факторам внешней среды, связанная в том числе и с экспрессией широкого спектра рецепторов. Всё больше данных свидетельствует о том, что жирные кислоты пищи уникальным образом изменяют метаболизм микроглиальных клеток и изменяют их «фенотип» (стимулируют их превращение в другую субпопуляцию) [131, 132, 138]. В недавних исследованиях было показано, что микроглия может реагировать на избыточное потребление насыщенных жиров, вызывая дисфункцию нейронов в медиабазальном гипоталамусе — области мозга, контролирующей энергетический метаболизм, и таким образом влияя на гипоталамический контроль метаболизма в других тканях [129].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, совокупность рассмотренных литературных данных, накопленных за последние годы, убедительно доказывает, что многие липиды служат межклеточными и внутриклеточными сигнальными молекулами, участвующими в нейроглиальных взаимодействиях, регулируя различные функции

головного мозга и способствующими реализации нейропластичности на разных уровнях. Как уже говорилось выше, сигнальные функции липидов тесно связаны с их метаболическими превращениями, поскольку многие «сигнальные» липиды обычно являются продуктами ферментативного расщепления или превращения «структурных» липидов плазматической мембраны. В то же время в мозге наблюдается выраженная компартментализация отдельных этапов метаболизма липидов между разными типами клеток нервной системы.

Так, процессы окисления жирных кислот и биосинтез холестерина во взрослом мозге в основном связаны с астроцитами, в то время как в олигодендроцитах биосинтез холестерина и гексозилцерамидов имеет самую высокую интенсивность на ранних этапах развития мозга. Пути превращения арахидоновой кислоты — жирной кислоты, вовлечённой в передачу сигналов воспаления — в основном осуществляются в микроглиальных клетках, обеспечивающих иммунные реакции и гомеостаз мозга. Тем не менее роль липидов в регуляции функций микроглиальных клеток и взаимоотношений их с другими клетками нервной ткани пока ещё мало изучена и представляется весьма перспективным направлением исследований. Роли липидов астроцитарных и олигодендроцитарных клеток в межклеточных взаимодействиях уделено в современной литературе больше внимания, однако здесь также остаётся много вопросов.

Интересным направлением, на наш взгляд, является изучение роли астроцитов в защите нейрона от окислительного стресса и участие в этом липидных капель. Мало изученной областью остаётся вклад ганглиозидов в процессы взаимодействия между аксоном и примыкающей к нему миелиновой мембраной. Отдельного направления исследований заслуживают процессы транспорта липидов между глиальными клетками.

Вклад авторов. О.В. Галкина, О.В. Ветровой, И.Е. Красовская, Н.Д. Ещенко — написание текста статьи; О.В. Галкина — анализ литературных данных; Н.Д. Ещенко, О.В. Ветровой — существенный вклад в концепцию и дизайн статьи; О.В. Галкина, О.В. Ветровой — подготовка наглядного материала; И.Е. Красовская — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) в рамках проекта НЦМУ Павловский центр «Интегративная физиология — медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости», направление: «Биологические и социальные основы инклюзии».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barres, B. A. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease, *Neuron*, **60**, 430-440, doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.013.
2. Jakel, S., and Dimou, L. (2017) Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation, *Front. Cell Neurosci.*, **11**, 24, doi: 10.3389/fncel.2017.00024.
3. Hatton, G. I. (2002) Glial-neuronal interactions in the mammalian brain, *Adv. Physiol. Educ.*, **26**, 225-237, doi: 10.1152/advan.00038.2002.
4. Galkina, O. V., Vetrovoy, O. V., and Eschenko, N. D. (2021) The role of lipids in implementing specific functions in the central nervous system, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47**, 1004-1013.
5. Sofroniew, M. V., and Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology, *Acta Neuropathol.*, **119**, 7-35, doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
6. Von Bartheld, C. S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016) The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting, *J. Comp. Neurol.*, **524**, 3865-3895, doi: 10.1002/cne.24040.
7. Abbott, N. J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 41-53, doi: 10.1038/nrn1824.
8. Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., and Welty, D. F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate, *Neuron*, **16**, 675-686, doi: 10.1016/s0896-6273(00)80086-0.
9. Simard, M., and Nedergaard, M. (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis, *Neuroscience*, **129**, 877-896, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.053.
10. Butt, A. M., and Kalsi, A. (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system

- glia: a special role for Kir4.1 in glial functions, *J. Cell Mol. Med.*, **10**, 33-44, doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00289.x.
11. Hewett, J. A. (2009) Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system, *J. Neurochem.*, **110**, 1717-1736, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06288.x.
 12. Allen, N. J., and Eroglu, C. (2017) Cell biology of astrocyte-synapse interactions, *Neuron*, **96**, 697-708, doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056.
 13. Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Syková, E., and Rouach, N. (2011) Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8467-8472, doi: 10.1073/pnas.1016650108.
 14. Varcianna, A., Myszczyńska, M. A., Castelli, L. M., O'Neill, B., Kim, Y., Talbot, J., Nyberg, S., Nyamali, I., Heath, P. R., Stopford, M. J., Hautbergue, G. M., and Ferraiuolo, L. (2019) Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS, *EBioMedicine*, **40**, 626-635, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.11.067.
 15. Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., and Barres, B. A. (2001) Control of synapse number by glia, *Science*, **291**, 657-661, doi: 10.1126/science.291.5504.657.
 16. Hu, R., Cai, W. Q., Wu, X. G., and Yang, Z. (2007) Astrocyte-derived estrogen enhances synapse formation and synaptic transmission between cultured neonatal rat cortical neurons, *Neuroscience*, **144**, 1229-1240, doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.09.056.
 17. Araque, A. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner, *Trends Neurosci.*, **22**, 208-215, doi: 10.1016/s0166-2236(98)01349-6.
 18. Harada, K., Kamiya, T., and Tsuboi, T. (2016) Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental, and pathological implications in the brain, *Front. Neurosci.*, **9**, 499, doi: 10.3389/fnins.2015.00499.
 19. Haydon, P. G., and Carmignoto, G. (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling, *Physiol. Rev.*, **86**, 1009-1031, doi: 10.1152/physrev.00049.2005.
 20. Fellin, T., and Carmignoto, G. (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit, *J. Physiol.*, **559** (Pt 1), 3-15, doi: 10.1113/jphysiol.2004.063214.
 21. Hamilton, N. B., and Attwell, D. (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 227-238, doi: 10.1038/nrn2803.
 22. Petrelli, F., and Bezzi, P. (2016) Novel insights into gliotransmitters, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **26**, 138-145, doi: 10.1016/j.coph.2015.11.010.
 23. Baldwin, K. T., and Eroglu, C. (2017) Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **45**, 113-120, doi: 10.1016/j.conb.2017.05.006.
 24. Barber, C. N., and Raben, D. M. (2019) Lipid metabolism crosstalk in the brain: glia and neurons, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 212, doi: 10.3389/fncel.2019.00212.
 25. Semyanov, A., and Verkhratsky, A. (2021) Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu, *Trends Neurosci.*, **44**, 781-792, doi: 10.1016/j.tins.2021.07.006.
 26. Fitzner, D., Bader, J. M., Penkert, H., Bergner, C. G., Su, M., Weil, M. T., Surma, M. A., Mann, M., Klose, C., and Simons, M. (2020) Cell-type- and brain-region-resolved mouse brain lipidome, *Cell Rep.*, **32**, 108132, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108132.
 27. Galkina, O. V., Putilina, F. E., and Eshchenko, N. D. (2014) Changes in the lipid composition of the brain during early ontogenesis, *Neurochem. J.*, **8**, 83-88, doi: 10.1134/S1819712414020044.
 28. Lee, J. A., Hall, B., Allsop, J., Alqarni, R., and Allen, S. P. (2021) Lipid metabolism in astrocytic structure and function, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **112**, 123-136, doi: 10.1016/j.semcdb.2020.07.017.
 29. Zhu, Y. B., Gao, W., Zhang, Y., Jia, F., Zhang, H. L., Liu, Y. Z., Sun, X. F., Yin, Y., and Yin, D. M. (2016) Astrocyte-derived phosphatidic acid promotes dendritic branching, *Sci. Rep.*, **6**, 21096, doi: 10.1038/srep21096.
 30. Cai, D., Zhong, M., Wang, R., Netzer, W. J., Shields, D., Zheng, H., Sisodia, S. S., Foster, D. A., Gorelick, F. S., Xu, H., and Greengard, P. (2006) Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1936-1940, doi: 10.1073/pnas.0510710103.
 31. Tanguy, E., Wang, Q., Moine, H., and Vitale, N. (2019) Phosphatidic acid: from pleiotropic functions to neuronal pathology, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 2, doi: 10.3389/fncel.2019.00002.
 32. Tabet, R., Moutin, E., Becker, J. A., Heintz, D., Fouillen, L., Flatter, E., Krężel, W., Alunni, V., Koebel, P., Dembélé, D., Tassone, F., Bardoni, B., Mandel, J. L., Vitale, N., Muller, D., Le Merrer, J., and Moine, H. (2016) Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E3619-E3628, doi: 10.1073/pnas.1522631113.
 33. Huang, P., Altshuler, Y. M., Hou, J. C., Pessin, J. E., and Frohman, M. A. (2005) Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase vD1, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 2614-2623, doi: 10.1091/mbc.e04-12-1124.
 34. Shirai, Y., and Saito, N. (2014) Diacylglycerol kinase as a possible therapeutic target for neuronal diseases, *J. Biomed. Sci.*, **21**, 28, doi: 10.1186/1423-0127-21-28.
 35. Lee, D., Kim, E., Tanaka-Yamamoto, K. (2016) Diacylglycerol kinases in the coordination of synaptic

- plasticity, *Front. Cell Dev. Biol.*, **4**, 92, doi: 10.3389/fcell.2016.00092.
36. Barber, C. N., and Raben, D. M. (2020) Roles of DGKs in neurons: postsynaptic functions? *Adv. Biol. Regul.*, **75**, 100688, doi: 10.1016/j.jbior.2019.100688.
 37. Hozumi, Y., Watanabe, M., Otani, K., and Goto, K. (2009) Diacylglycerol kinase beta promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons, *BMC Neurosci.*, **10**, 99, doi: 10.1186/1471-2202-10-99.
 38. Shirai, Y., Kouzuki, T., Kakefuda, K., Moriguchi, S., Oyagi, A., Horie, K., Morita, S. Y., Shimazawa, M., Fukunaga, K., Takeda, J., Saito, N., and Hara, H. (2010) Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGKbeta in neurite spine formation, contributing to cognitive function, *PLoS One*, **5**, e11602, doi: 10.1371/journal.pone.0011602.
 39. Seo, J., Kim, K., Jang, S., Han, S., Choi, S. Y., and Kim, E. (2012) Regulation of hippocampal long-term potentiation and long-term depression by diacylglycerol kinase ζ , *Hippocampus*, **22**, 1018-1026, doi: 10.1002/hipo.20889.
 40. Goto, K., Watanabe, M., Kondo, H., Yuasa, H., Sakane, F., and Kanoh, H. (1992) Gene cloning, sequence, expression and in situ localization of 80 kDa diacylglycerol kinase specific to oligodendrocyte of rat brain, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **16**, 75-87, doi: 10.1016/0169-328x(92)90196-i.
 41. Wheeler, S. E., Stacey, H. M., Nahaei, Y., Hale, S. J., Hardy, A. B., Reimann, F., Gribble, F. M., Larraufie, P., Gaisano, H. Y., and Brubaker, P. L. (2017) The SNARE protein syntaxin-1a plays an essential role in biphasic exocytosis of the incretin hormone glucagon-like peptide 1, *Diabetes*, **66**, 2327-2338, doi: 10.2337/db16-1403.
 42. Tanguy, E., Kassas, N., and Vitale, N. (2018) Protein-phospholipid interaction motifs: a focus on phosphatidic acid, *Biomolecules*, **8**, 20, doi: 10.3390/biom8020020.
 43. Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W. H., and van Blitterswijk, W. J. (1994) Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids, *Biochem. J.*, **304** (Pt 3), 1001-1008, doi: 10.1042/bj3041001.
 44. Jang, J.-H., Lee, C. S., Hwang, D., and Ryu, S. H. (2012) Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners, *Prog. Lipid Res.*, **51**, 71-81, doi: 10.1016/j.plipres.2011.12.003.
 45. Park, C., Kang, D. S., Shin, G. H., Seo, J., Kim, H., Suh, P. G., Bae, C. D., and Shin, J. H. (2015) Identification of novel phosphatidic acid-binding proteins in the rat brain, *Neurosci. Lett.*, **595**, 108-113, doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.012.
 46. Kassas, N., Tanguy, E., Thahouly, T., Fouillen, L., Heintz, D., Chasserot-Golaz, S., Bader, M. F., Grant, N. J., and Vitale, N. (2017) Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis, *J. Biol. Chem.*, **292**, 4266-4279, doi: 10.1074/jbc.M116.742346.
 47. Sang, N., Zhang, J., Marcheselli, V., Bazan, N. G., and Chen, C. (2005) Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor, *J. Neurosci.*, **25**, 9858-9870, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2392-05.2005.
 48. Lima, I. V., Bastos, L. F., Limborço-Filho, M., Fiebich, B. L., and de Oliveira, A. C. (2012) Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases, *Mediators Inflamm.*, **2012**, 946813, doi: 10.1155/2012/946813.
 49. Pedersen, A. L., and Saldanha, C. J. (2017) Reciprocal interactions between prostaglandin E2- and estradiol-dependent signaling pathways in the injured zebra finch brain, *J. Neuroinflamm.*, **14**, 262, doi: 10.1186/s12974-017-1040-1.
 50. Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. A., and Newman, E. A. (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow, *Nature*, **468**, 232-243, doi: 10.1038/nature09613.
 51. Liu, Y., Zhang, H., Wu, C. Y., Yu, T., Fang, X., Ryu, J. J., Zheng, B., Chen, Z., Roman, R. J., and Fan, F. (2021) 20-HETE-promoted cerebral blood flow autoregulation is associated with enhanced pericyte contractility, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **154**, 106548, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2021.106548.
 52. Navarrete, M., Perea, G., Maglio, L., Pastor, J., García de Sola, R., and Araque, A. (2013) Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue, *Cereb. Cortex*, **23**, 1240-1246, doi: 10.1093/cercor/bhs122.
 53. Navarrete, M., Díez, A., and Araque, A. (2014) Astrocytes in endocannabinoid signalling, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **369**, 20130599, doi: 10.1098/rstb.2013.0599.
 54. Rouzer, C. A., and Marnett, L. J. (2011) Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways, *Chem. Rev.*, **111**, 5899-5921, doi: 10.1021/cr2002799.
 55. Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., and Meisel, A. (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function, *Trends Neurosci.*, **36**, 587-597, doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
 56. Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D., and Baranowska-Bosiacka, I. (2015) Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 25959-25981, doi: 10.3390/ijms161125939.

57. Furuya, S.T., Tabata, J., Mitoma, K., Yamada, M., Yamasaki, A., Makino, A., Yamamoto, T., Watanabe, M., Kano, M., and Hirabayashi, Y. (2000) L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11528-11533, doi: 10.1073/pnas.200364497.
58. Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L. G., and Guizzetti, M. (2013) Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1831**, 263-275, doi: 10.1016/j.bbalip.2012.09.007.
59. Van Deijk, A. F., Camargo, N., Timmerman, J., Heistek, T., Brouwers, J. F., Mogavero, F., Mansvelder, H. D., Smit, A. B., and Verheijen, M. H. (2017) Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function *in vivo*, *Glia*, **65**, 670-682, doi: 10.1002/glia.23120.
60. McPherson, P.A., and McEneny, J. (2012) The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress, *J. Physiol. Biochem.*, **68**, 141-151, doi: 10.1007/s13105-011-0112-4.
61. Schonfeld, P., and Reiser, G. (2013) Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **33**, 1493-1499, doi: 10.1038/jcbfm.2013.128.
62. Speijer, D., Manjeri, G. R., and Szklarczyk, R. (2014) How to deal with oxygen radicals stemming from mitochondrial fatty acid oxidation, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **369**, 20130446, doi: 10.1098/rstb.2013.0446.
63. Bailey, A. P., Koster, G., Guillermier, C., Hirst, E. M., MacRae, J. I., Lechene, C. P., Postle, A. D., and Gould, A. P. (2015) Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of *Drosophila*, *Cell*, **163**, 340-353, doi: 10.1016/j.cell.2015.09.020.
64. Smolič, T., Zorec, R., and Vardjan, N. (2021) Pathophysiology of lipid droplets in neuroglia, *Antioxidants*, **11**, 22, doi: 10.3390/antiox11010022.
65. Ioannou, M. S., Jackson, J., Sheu, S. H., Chang, C. L., Weigel, A. V., Liu, H., Pasolli, H. A., Xu, C. S., Pang, S., Matthies, D., Hess, H. F., Lippincott-Schwartz, J., and Liu, Z. (2019) Neuron-astrocyte metabolic coupling protects against activity-induced fatty acid toxicity, *Cell*, **177**, 1522-1535.e14, doi: 10.1016/j.cell.2019.04.001.
66. Yang, D., Wang, X., Zhang, L., Fang, Y., Zheng, Q., Liu, X., Yu, W., Chen, S., Ying, J., and Hua, F. (2022) Lipid metabolism and storage in neuroglia: role in brain development and neurodegenerative diseases, *Cell Biosci.*, **12**, 106, doi: 10.1186/s13578-022-00828-0.
67. Moore, S. A. (2001) Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells *in vitro*, *J. Mol. Neurosci.*, **16**, 195-200, discussion 215-221, doi: 10.1385/JMN:16:2-3:195.
68. Nieweg, K., Schaller, H., and Pfrieder, F. W. (2009) Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats, *J. Neurochem.*, **109**, 125-134, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x.
69. Garcia Corrales, A. V., Haidar, M., Bogie, J. F. J., and Hendriks, J. J. A. (2021) Fatty acid synthesis in glial cells of the CNS, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8159, doi: 10.3390/ijms22158159.
70. Aizawa, F., Nishinaka, T., Yamashita, T., Nakamoto, K., Koyama, Y., Kasuya, F., and Tokuyama, S. (2016) Astrocytes release polyunsaturated fatty acids by lipopolysaccharide stimuli, *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 1100-1106, doi: 10.1248/bpb.b15-01037.
71. Pfrieder, F. W., and Ungerer, N. (2011) Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes, *Progr. Lipid Res.*, **50**, 357-371, doi: 10.1016/j.plipres.2011.06.002.
72. Orth, M., and Bellosta, S. (2012) Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders, *Cholesterol*, **2012**, 292598, doi: 10.1155/2012/292598.
73. Zhang, J., and Liu, Q. (2015) Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain, *Protein Cell*, **6**, 254-264, doi: 10.1007/s13238-014-0131-3.
74. Dietschy, J. M., and Turley, S. D. (2004) Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal, *J. Lipid Res.*, **45**, 1375-1397, doi: 10.1194/jlr.R400004-JLR200.
75. Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., and Pfrieder, F. W. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol, *Science*, **294**, 1354-1357, doi: 10.1126/science.294.5545.1354.
76. Göritz, C., Mauch, D. H., Nägler, K., and Pfrieder, F. W. (2002) Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair, *J. Physiol. Paris*, **96**, 257-263, doi: 10.1016/s0928-4257(02)00014-1.
77. Moutinho, M., Nunes, M. J., and Rodrigues, E. (2017) The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol, *Exp. Cell Res.*, **360**, 55-60, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.034.
78. Lloyd-Evans, E., and Waller-Evans, H. (2020) Biosynthesis and signalling functions of central and peripheral nervous system neurosteroids in health and disease, *Essays Biochem.*, **64**, 591-606, doi: 10.1042/EBC20200043.
79. Camargo, N., Brouwers, J. F., Loos, M., Gutmann, D. H., Smit, A. B., and Verheijen, M. H. (2012) High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism, *FASEB J.*, **26**, 4302-4315, doi: 10.1096/fj.12-205807.
80. Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F., and Hutter, W. B. (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 42-49, doi: 10.1038/71366.
81. Petrov, A. M., Kasimov, M. R., and Zefirov, A. L. (2016) Brain cholesterol metabolism and its

- defects: linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction, *Acta Naturae*, **8**, 58-73, doi: 10.32607/20758251-2016-8-1-58-73.
82. Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., and Rasenick, M. M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling, *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 128-140, doi: 10.1038/nrn2059.
 83. Delle Bovi, R. J., Kim, J., Suresh, P., London, E., and Miller, W. T. (2019) Sterol structure dependence of insulin receptor and insulin-like growth factor 1 receptor activation, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1861**, 819-826, doi: 10.1016/j.bbamem.2019.01.009.
 84. Tracey, T. J., Steyn, F. J., Wolvetang, E. J., and Ngo, S. T. (2018) Neuronal lipid metabolism: multiple pathways driving functional outcomes in health and disease, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 10, doi: 10.3389/fnmol.2018.00010.
 85. Bruce, K. D., Zsombok, A., and Eckel, R. H. (2017) Lipid processing in the brain: a key regulator of systemic metabolism, *Front. Endocrinol.*, **8**, 60, doi: 10.3389/fendo.2017.00060.
 86. Killoy, K. M., Harlan, B. A., Pehar, M., and Vargas, M. R. (2020) FABP7 upregulation induces a neurotoxic phenotype in astrocytes, *Glia*, **68**, 2693-2704, doi: 10.1002/glia.23879.
 87. Kagawa, Y., Yasumoto, Y., Sharifi, K., Ebrahimi, M., Islam, A., Miyazaki, H., Yamamoto, Y., Sawada, T., Kishi, H., Kobayashi, S., Maekawa, M., Yoshikawa, T., Takaki, E., Nakai, A., Kogo, H., Fujimoto, T., and Owada, Y. (2015) Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1, *Glia*, **63**, 780-794, doi: 10.1002/glia.22784.
 88. Ebrahimi, M., Yamamoto, Y., Sharifi, K., Kida, H., Kagawa, Y., Yasumoto, Y., Islam, A., Miyazaki, H., Shimamoto, C., Maekawa, M., Mitsushima, D., Yoshikawa, T., and Owada, Y. (2016) Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons, *Glia*, **64**, 48-62, doi: 10.1002/glia.22902.
 89. Liu, L., MacKenzie, K. R., Putluri, N., Maletić-Savatić, M., and Bellen, H. J. (2017) The glia-neuron lactate shuttle and elevated ros promote lipid synthesis in neurons and lipid droplet accumulation in glia via APOE/D, *Cell Metab.*, **26**, 719-737.e6, doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.024.
 90. Wang, H., and Eckel, R. H. (2014) What are lipoproteins doing in the brain? *Trends Endocrinol. Metab.*, **25**, 8-14, doi: 10.1016/j.tem.2013.10.003.
 91. Evola, M., Hall, A., Wall, T., Young, A., and Grammas, P. (2010) Oxidative stress impairs learning and memory in apoE knockout mice, *Pharm. Biochem. Behav.*, **96**, 181-186, doi: 10.1016/j.pbb.2010.05.003.
 92. Weeber, E. J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J. M., Forster, E., Sweatt, J. D., and Herz, J. (2002) Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning, *J. Biol. Chem.*, **277**, 39944-39952, doi: 10.1074/jbc.M205147200.
 93. Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., Fagan, A. M., Morris, J. C., Mawuenyega, K. G., Cruchaga, C., Goate, A. M., Bales, K. R., Paul, S. M., Bateman, R. J., and Holtzman, D. M. (2011) Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance, *Sci. Transl. Med.*, **3**, 89ra57, doi: 10.1126/scitranslmed.3002156.
 94. Jones, P. B., Adams, K. W., Rozkalne, A., Spires-Jones, T. L., Hsieh, T. T., Hashimoto, T., von Armin, C. A., Mielke, M., Bacska, B. J., and Hyman, B. T. (2011) Apolipoprotein E: isoform specific differences in tertiary structure and interaction with amyloid-beta in human Alzheimer brain, *PLoS One*, **6**, e14586, doi: 10.1371/journal.pone.0014586.
 95. Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C. C., and Bu, G. (2019) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies, *Nat. Rev. Neurol.*, **15**, 501-518, doi: 10.1038/s41582-019-0228-7.
 96. Yin, J., Spillman, E., Cheng, E. S., Short, J., Chen, Y., Lei, J., Gibbs, M., Rosenthal, J. S., Sheng, C., Chen, Y. X., Veerasammy, K., Choetso, T., Abzalimov, R., Wang, B., Han, C., He, Y., and Yuan, Q. (2021) Brain-specific lipoprotein receptors interact with astrocyte derived apolipoprotein and mediate neuron-glia lipid shuttling, *Nat. Commun.*, **12**, 2408, doi: 10.1038/s41467-021-22751-7.
 97. Cartocci, V., Servadio, M., Trezza, V., and Pallottini, V. (2017) Can cholesterol metabolism modulation affect brain function and behavior? *J. Cell Physiol.*, **232**, 281-286, doi: 10.1002/jcp.25488.
 98. Alecu, I., and Bennett, S. (2019) Dysregulated lipid metabolism and its role in α -synucleinopathy in Parkinson's disease, *Front. Neurosci.*, **13**, 328, doi: 10.3389/fnins.2019.00328.
 99. Adibhatla, R. M., and Hatcher, J. F. (2007) Role of lipids in brain injury and diseases, *Fut. Lipidol.*, **2**, 403-422, doi: 10.2217/17460875.2.4.403.
 100. Nave, K. A. (2010) Myelination and the trophic support of long axons, *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 275-283, doi: 10.1038/nrn2797.
 101. Butt, A. M., Papanikolaou, M., and Rivera, A. (2019) Physiology of oligodendroglia, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1175**, 117-128, doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_5.
 102. Sakry, D., Karram, K., and Trotter, J. (2011) Synapses between NG2 glia and neurons, *J. Anat.*, **219**, 2-7, doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01359.x.
 103. Papanikolaou, M., Butt, A. M., and Lewis, A. (2020) A critical role for the inward rectifying potassium channel Kir7.1 in oligodendrocytes of the mouse optic nerve, *Brain Struct. Funct.*, **225**, 925-934, doi: 10.1007/s00429-020-02043-4.
 104. Cherchi, F., Bulli, I., Venturini, M., Pugliese, A. M., and Coppi, E. (2021) Ion channels as new attractive

- targets to improve re-myelination processes in the brain, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7277, doi: 10.3390/ijms22147277.
105. Gopalakrishnan, G., Awasthi, A., Belkaid, W., De Faria, O. Jr., Liazoghli, D., Colman, D. R., and Dhaunchak, A. S. (2013) Lipidome and proteome map of myelin membranes, *J. Neurosci. Res.*, **91**, 321-334, doi: 10.1002/jnr.23157.
 106. Löhmann, C., Schachmann, E., Dandekar, T., Villmann, C., and Becker, C. M. (2010) Developmental profiling by mass spectrometry of phosphocholine containing phospholipids in the rat nervous system reveals temporo-spatial gradients, *J. Neurochem.*, **114**, 1119-1134, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06836.x.
 107. Montani, L. (2021) Lipids in regulating oligodendrocyte structure and function, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **112**, 114-122, doi: 10.1016/j.semcdb.2020.07.016.
 108. Kassmann, C. M. (2014) Myelin peroxisomes – essential organelles for the maintenance of white matter in the nervous system, *Biochimie*, **98**, 111-118, doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.020.
 109. Singhal, N. K., Huang, H., Li, S., Clements, R., Gadd, J., Daniels, A., Kooijman, E. E., Bannerman, P., Burns, T., Guo, F., Pleasure, D., Freeman, E., Shriver, L., and McDonough, J. (2017) The neuronal metabolite NAA regulates histone H3 methylation in oligodendrocytes and myelin lipid composition, *Exp. Brain Res.*, **235**, 279-292, doi: 10.1007/s00221-016-4789-z.
 110. Saher, G., Brügger, B., Lappe-Siefke, C., Möbius, W., Tozawa, R., Wehr, M. C., Wieland, F., Ishibashi, S., and Nave, K. A. (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth, *Nat. Neurosci.*, **8**, 468-475, doi: 10.1038/nn1426.
 111. Saher, G., and Stumpf, S. K. (2015) Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders, *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 1083-1094, doi: 10.1016/j.bbalip.2015.02.010.
 112. Mathews, E. S., Mawdsley, D. J., Walker, M., Hines, J. H., Pozzoli, M., and Appel, B. (2014) Mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase I reveals requirements for isoprenoid and cholesterol synthesis in oligodendrocyte migration arrest, axon wrapping, and myelin gene expression, *J. Neurosci.*, **34**, 3402-3412, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4587-13.2014.
 113. Camargo, N., Goudriaan, A., van Deijk, A. F., Otte, W. M., Brouwers, J. F., Lodder, H., Gutmann, D. H., Nave, K. A., Dijkhuizen, R. M., Mansvelder, H. D., Chrast, R., Smit, A. B., and Verheijen, M. H. G. (2017) Oligodendroglial myelination requires astrocyte-derived lipids, *PLoS Biol.*, **15**, e1002605, doi: 10.1371/journal.pbio.1002605.
 114. Yu, T., and Lieberman, A. P. (2013) Npc1 acting in neurons and glia is essential for the formation and maintenance of CNS myelin, *PLoS Genet.*, **9**, e1003462, doi: 10.1371/journal.pgen.1003462.
 115. Mathews, E. S., and Appel, B. (2016) Cholesterol biosynthesis supports myelin gene expression and axon ensheathment through modulation of P13K/Akt/mTor signaling, *J. Neurosci.*, **36**, 7628-7639, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0726-16.2016.
 116. Posse de Chaves, E., and Sipione, S. (2010) Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction, *FEBS Lett.*, **584**, 1748-1759, doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.010.
 117. Bonetto, G., and Di Scala, C. (2019) Importance of lipids for nervous system integrity: cooperation between gangliosides and sulfatides in myelin stability, *J. Neurosci.*, **39**, 6218-6220, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0377-19.2019.
 118. Susuki, K., Baba, H., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K., Furukawa, K., Furukawa, K., Rasband, M. N., and Yuki, N. (2007) Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers, *Glia*, **55**, 746-757, doi: 10.1002/glia.20503.
 119. Ishibashi, T., Dupree, J. L., Ikenaka, K., Hirahara, Y., Honke, K., Peles, E., Popko, B., Suzuki, K., Nishino, H., and Baba, H. (2002) A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation, *J. Neurosci.*, **22**, 6507-6514, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06507.2002.
 120. Yang, L. J., Zeller, C. B., Shaper, N. L., Kiso, M., Hasegawa, A., Shapiro, R. E., and Schnaar, R. L. (1996) Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 814-818, doi: 10.1073/pnas.93.2.814.
 121. Vinson, M., Strijbos, P. J., Rowles, A., Facci, L., Moore, S. E., Simmons, D. L., and Walsh, F. S. (2001) Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition, *J. Biol. Chem.*, **276**, 20280-20285, doi: 10.1074/jbc.M100345200.
 122. Pronker, M., Lemstra, S., Snijder, J., Heck, A. J., Thies-Weesie, D. M., Pasterkamp, R. J., and Janssen, B. J. (2016) Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling, *Nat. Commun.*, **7**, 13584, doi: 10.1038/ncomms13584.
 123. Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T., and Sanai, Y. (2000) Involvement of gangliosides in glycosylphosphatidylinositol-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling in lipid rafts, *J. Biol. Chem.*, **275**, 34701-34709, doi: 10.1074/jbc.M003163200.
 124. Loberto, N., Prioni, S., Prinetti, A., Ottico, E., Chigorno, V., Karageorgos, D., and Sonnino, S. (2003) The adhesion protein TAG-1 has a ganglioside environment in the sphingolipid-enriched membrane domains of neuronal cells in culture, *J. Neurochem.*, **85**, 224-233, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01655.x.
 125. Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J.,

- Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A., and Stevens, B. (2019) Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes, *Immunity*, **50**, 253–271.e6, doi: 10.1016/j.immuni.2018.11.004.
126. Li, Q., and Barres, B. (2018) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **18**, 225–242, doi: 10.1038/nri.2017.125.
127. Loving, B. A., and Bruce, K. D. (2020) Lipid and lipoprotein metabolism in microglia, *Front. Physiol.*, **11**, 393, doi: 10.3389/fphys.2020.00393.
128. Lombardi, M., Parolisi, R., Scaroni, F., Bonfanti, E., Gualerzi, A., Gabrielli, M., Kerlero de Rosbo, N., Uccelli, A., Giussani, P., Viani, P., Garlanda, C., Abbracchio, M. P., Chaabane, L., Buffo, A., Fumagalli, M., and Verderio, C. (2019) Detrimental and protective action of microglial extracellular vesicles on myelin lesions: astrocyte involvement in remyelination failure, *Acta Neuropathol.*, **138**, 987–1012, doi: 10.1007/s00401-019-02049-1.
129. Folick, A., Koliwad, S. K., and Valdearcos, M. (2021) Microglial lipid biology in the hypothalamic regulation of metabolic homeostasis, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **12**, 668396, doi: 10.3389/fendo.2021.668396.
130. Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., and Gross, C. T. (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior, *Nat. Neurosci.*, **17**, 400–406, doi: 10.1038/nn.3641.
131. Chausse, B., Kakimoto, P. A., and Kann, O. (2021) Microglia and lipids: how metabolism controls brain innate immunity, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **112**, 137–144, doi: 10.1016/j.semcdb.2020.08.001.
132. Chausse, B., Kakimoto, P. A., Caldeira-da-Silva, C. C., Chaves-Filho, A. B., Yoshinaga, M. Y., Yoshinaga, M. Y., da Silva, R. P., Miyamoto, S., and Kowalski, A. J. (2019) Distinct metabolic patterns during microglial remodeling by oleate and palmitate, *Biosci. Rep.*, **39**, BSR20190072, doi: 10.1042/BSR20190072.
133. Bohlen, C. J., Bennett, F. C., Tucker, A. F., Collins, H. Y., Mulinyawe, S. B., and Barres, B. A. (2017) Diverse requirements for microglial survival, specification, and function revealed by defined-medium cultures, *Neuron*, **94**, 759–773.e8, doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.043.
134. Kopper, T. J., and Gensel, J. C. (2018) Myelin as an inflammatory mediator: myelin interactions with complement, macrophages, and microglia in spinal cord injury, *J. Neurosci. Res.*, **96**, 969–977, doi: 10.1002/jnr.24114.
135. Grajchen, E., Wouters, E., van de Haterd, B., Haidar, M., Hardonnière, K., Dierckx, T., Van Broeckhoven, J., Erens, C., Hendrix, S., Kerdine-Römer, S., Hendriks, J. J. A., and Bogie, J. F. J. (2020) CD36-mediated uptake of myelin debris by macrophages and microglia reduces neuroinflammation, *J. Neuroinflammation*, **17**, 224, doi: 10.1186/s12974-020-01899-x.
136. Cantuti-Castelvetri, L., Fitzner, D., Bosch-Queralt, M., Weil, M.-T., Su, M., and Sen, P. (2018) Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system, *Science*, **359**, 684, doi: 10.1126/science.aan4183.
137. Berghoff, S. A., Spieth, L., Sun, T., Hosang, L., Schlaphoff, L., Depp, C., Düking, T., Winchenbach, J., Neuber, J., Ewers, D., Scholz, P., van der Meer, F., Cantuti-Castelvetri, L., Sasmita, A. O., Meschkat, M., Ruhwedel, T., Möbius, W., Sankowski, R., Prinz, M., Huitinga, I., Sereda, M. W., Odoardi, F., Ischebeck, T., Simons, M., Stadelmann-Nessler, C., Edgar, J. M., Nave, K. A., and Saher, G. (2021) Microglia facilitate repair of demyelinated lesions via post-squalene sterol synthesis, *Nat. Neurosci.*, **24**, 47–60, doi: 10.1038/s41593-020-00757-6.
138. Leyrolle, Q., Layé, S., and Nadjar, A. (2019) Direct and indirect effects of lipids on microglia function, *Neurosci. Lett.*, **708**, 134348, doi: 10.1016/j.neulet.2019.134348.

THE ROLE OF LIPID IN THE REGULATION OF NEUROGLIAL INTERACTIONS

Review

O. V. Galkina^{1*}, O. V. Vetrovoy^{1,2}, I. E. Krasovskaya¹, and N. D. Eschenko¹

¹ Biochemistry Department, Faculty of Biology, Saint-Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia; e-mail: o.v.galkina@spbu.ru

² Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 199034 St. Petersburg, Russia

Lipids are an extremely heterogeneous group of compounds, resulting in a wide variety of biological functions they perform. The traditional view of lipids as important structural components of the cell and compounds playing a trophic role is currently being supplemented by information on the possible participation of lipids in signaling, not only intracellular, but also intercellular. The review article discusses current data on the role of lipids and their metabolites formed in glial cells (astrocytes, oligodendrocytes, microglia) in the communication of these cells with neurons. In addition to the metabolic transformations of lipids in each type of glial cells, special attention is paid to the lipid signal molecules (phosphatidic acid, arachidonic acid and its metabolites, cholesterol, etc.) and the possibility of their participation in the implementation of the synaptic plasticity, as well as in other possible mechanisms associated with the realization of the neuroplasticity. The generalization of these new data can significantly expand knowledge about the regulatory functions of lipids in neuroglial relationships.

Keywords: central nervous system, brain, synaptic plasticity, neurons, astrocytes, oligodendrocytes, microglia, neuronal-glial interactions, lipids, lipid metabolism

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГИППОКАМПА КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© 2023 Г.П. Диеспиров, Т.Ю. Постникова, А.В. Грифлюк,
А.А. Коваленко, А.В. Зайцев*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: aleksey_zaitsev@mail.ru*

Поступила в редакцию 09.11.2022

После доработки 07.01.2023

Принята к публикации 10.01.2023

Эпилептический статус (ЭС) запускает множество патологических изменений в нервной системе, которые еще не до конца изучены и могут вести к развитию эпилепсии. В этой работе мы изучили эффекты действия ЭС на характеристики возбуждающей глутаматергической передачи в гиппокампе у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Исследования проводились через 1 день (острая фаза модели), 3 и 7 дней (латентная фаза) и 30–80 дней (хроническая фаза) после ЭС. Используя метод ОТ-ПЦР в реальном времени, мы обнаружили, что в латентную фазу происходит снижение экспрессии генов субъединиц GluA1 и GluA2 AMPA-рецепторов, что может также сопровождаться повышением доли кальций-проницаемых AMPA-рецепторов, играющих существенную роль в патогенезе многих заболеваний ЦНС. В переживающих срезах мозга при регистрации полевых ответов в области CA1 гиппокампа в ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера электрическим током разной силы мы выявили снижение эффективности возбуждающей синаптической нейротрансмиссии во всех фазах модели. Однако в хронической фазе обнаружили увеличение частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических потенциалов, что свидетельствует о повышенной фоновой активности глутаматергической системы при эпилепсии. В пользу этого также указывает снижение порога экстензии задних конечностей в тесте максимального электрошока у крыс с височной эпилепсией по сравнению с контрольными животными. Полученные результаты свидетельствуют о наличии ряда функциональных изменений в глутаматергической системе, связанных с эпилептизацией мозга. Эти данные могут быть использованы для разработки антиэпилептогенной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: литий-пилокарпиновая модель эпилепсии, синапс, AMPA-рецептор, гиппокамп, полевой постсинаптический потенциал, возбуждающий постсинаптический потенциал, тест максимального электрошока.

DOI: 10.31857/S0320972523030053, **EDN:** QWLEGQ

ВВЕДЕНИЕ

Височная эпилепсия (ВЭ) является одним из распространенных неврологических расстройств, и почти в 30% от всех случаев ВЭ не поддается фармакологическому лечению [1], что ухудшает качество жизни пациентов [2]. ВЭ может развиваться после однократного повреждающего воздействия на мозг, такого как эпилептический статус (ЭС), черепномозговая

травма, длительные фебрильные судороги, инфекционное заболевание ЦНС, инсульт [3–5], запускающие эпилептогенез. Эпилептогенез представляет собой каскад функциональных и структурных изменений в ткани мозга, приводящий к развитию спонтанных рецидивирующих судорог (СРС) [6, 7]. Наиболее часто при ВЭ страдает гиппокамп [8], который играет важную роль в формировании памяти [9], поэтому для ВЭ характерны коморбидные

Принятые сокращения: ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал; ВЭ – височная эпилепсия; МЭШ – максимальный электрошок; пПСП – полевой постсинаптический потенциал; ПС – популяционный спайк; прПСП – пресинаптический популяционный спайк; СРС – спонтанные рецидивирующие судороги; ЭС – эпилептический статус.

* Адресат для корреспонденции.

когнитивные нарушения [10, 11]. Несмотря на то что механизмы эпилептогенеза активно изучаются, до сих пор полная последовательность событий остается неясной, а надежных терапевтических подходов, предотвращающих эпилептогенез, пока не разработано [6, 12].

Для изучения эпилептогенеза и приобретенной ВЭ используется моделирование на животных. Литий-пилокарпиновая модель ВЭ у крыс является общепринятой моделью, т.к. повторяет все особенности болезни человека [13]. Основными признаками этой модели являются: наличие длительного ЭС; острая фаза с судорожным состоянием длительностью до суток; латентная фаза длительностью 3–4 недели (фаза эпилептогенеза); хроническая фаза, в которой у животных развиваются СРС [13, 14].

При эпилептизации ткани мозга происходят морфологические и функциональные изменения в организации синаптических контактов [15]. Например, выявлено разрастание мшистых волокон и формирование абберантных синаптических контактов в зубчатой извилине и области СА3 гиппокампа [16, 17]. Ранее нами было показано снижение уровня долговременной синаптической потенциации в поле СА1 гиппокампа в латентную и хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели [18–20].

После эпилептических судорог нередко нарушается синаптическая передача, включая изменение вероятности выброса медиатора [21], числа и плотности глутаматных рецепторов на постсинаптической мембране [22, 23], перестройку их субъединичного состава [24–27]. Данные, полученные в разных лабораториях и/или на разных моделях эпилепсии, и клинические данные часто являются противоречивыми (для обзора см. Zaitsev et al. [15]). Это свидетельствует о том, что ЭС может запускать различные компенсаторные механизмы в нервной системе. В некоторых случаях эти механизмы позволяют предотвратить развитие эпилепсии, а в других — болезнь прогрессирует. Понимание того, какие именно изменения в синапсах происходят после эпилептической активности, может лечь в основу рационально обоснованной терапии предотвращения эпилептогенеза и развития эпилепсии.

В данной работе мы изучили изменения свойств синаптической передачи нейронов поля СА1 гиппокампа, уровень экспрессии генов субъединиц AMPA-рецепторов в дорзальном гиппокампе, а также предрасположенность к формированию судорожных состояний у крыс в различные периоды времени после пилокарпин-индуцированного ЭС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследование проводили на самцах крыс Вистар. Животных содержали в виварии при комнатной температуре, 12-часовом цикле день/ночь и свободном доступе к пище и воде.

Литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии у крыс. Крысам в возрасте трех недель внутрибрюшинно (в/б) вводили раствор LiCl (127 мг/кг; «Sigma-Aldrich», США), через сутки в/б вводили раствор нитрата метилскополамина (0,5 мг/кг; «Sigma-Aldrich»), еще через 40–50 мин в/б вводили пилокарпин (30 мг/кг; «Sigma-Aldrich»), который приводил к ЭС. Контрольным крысам вводили те же препараты, за исключением пилокарпина, который заменяли на 0,9%-ный раствор NaCl.

Тяжесть судорог оценивали по модифицированной шкале лимбических судорог Расина [28]: 1 балл — подергивание челюстей и лицевых мышц; 2 балла — усиление лицевого клонуса с переходом на мышцы туловища; 3 балла — клонические сокращения передних лап; 4 балла — спячивание (подъем на задние лапы с опорой на лапы и хвост); 5 баллов — спячивание и падение на бок с клоническими судорогами конечностей, генерализацией приступа и переходом в тонические судороги с полной потерей позы. Судороги с оценкой 4 балла и выше, продолжающиеся более 15 мин, оценивали как ЭС. Как правило, через 30 мин после введения пилокарпина у большинства животных развивались судороги, достигающие 4 и более баллов. В эксперименты отбирались только крысы, у которых судороги от 4 баллов и выше продолжались не менее 90 мин. Тяжелые тонико-клонические судороги, вызванные пилокарпином, приводят к высокой смертности у животных, на уровне ~50%.

Литий-пилокарпиновая модель условно разделяется на 3 фазы, в каждую из которых были проведены экспериментальные исследования: острая фаза — 1-й день; латентная фаза (эпилептогенез без внешних проявлений) — 3-й и 7-й дни; хроническая фаза (появление СРС) наступает через 3–4 недели после ЭС. В ходе данной работы не проводилось отдельных экспериментов по регистрации СРС у крыс. Исследование свойств базовой нейротрансмиссии и кратковременной пластичности проводили через 30–35 дней после ЭС, регистрацию спонтанных синаптических событий — через 40–50 дней, биохимические исследования — через 60 дней, порог развития судорог у крыс — через 70–80 дней. Число крыс, использованных в экспериментах,

Таблица 1. Число животных, использованных в экспериментах

Фаза	Группа	ОТ-ПЦР	Электрофизиологические эксперименты		МЭШ
			Полевые отведения	Патч-кламп	
Острая фаза	Контроль	10	8	—	—
	ВЭ	9	14	—	—
Латентная фаза	Контроль	11	6	—	—
	ВЭ	6	23	—	—
Хроническая фаза	Контроль	12	10	6	15
	ВЭ	7	12	4	21

Примечание. МЭШ — метод максимального электрошока.

указано в табл. 1. Одни и те же животные могли быть использованы в разных экспериментах, если это было методически возможно.

Электрофизиологические эксперименты и анализ результатов. Крысу анестезировали при помощи изофлурана («Laboratorios Karizoo», Испания), декапитировали, быстро извлекали мозг и изготавливали горизонтальные переживающие срезы мозга, содержащие дорзальный гиппокамп, толщиной 350 мкм на вибраторе Microm International HM 650V («Microm International», Германия) в охлажденной до 0 °C и аэрируемой карбогеном (95% O₂/5% CO₂) искусственной спинномозговой жидкости следующего состава (в mM): 126 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, 10 глюкоза. После изготовления срезы помещали в водяную баню при 35 °C на 60 мин. От одного животного в эксперименте использовали обычно 1–3 среза.

Эксперименты проводили при температуре 30 °C. Регистрацию полевых постсинаптических потенциалов (пПСП) осуществля-

ли от лучистого слоя поля CA1 гиппокампа крыс при помощи боросиликатного стеклянного микроэлектрода (0,2–1,0 Мом; «World Precision Instruments», США) (рис. 1, а).

Срезы стимулировали парными прямоугольными импульсами каждые 20 с (длительность импульса — 0,1 мс; межстимульный интервал — 50 мс) с помощью биполярного нихромового электрода на границе полей CA3–CA1 стимулятором А365 («World Precision Instruments»). Полевые ПСП регистрировали с помощью усилителя Model 1800 («AM Systems», США), оцифровывали на ЦАП/АЦП NI USB-6211 («National Instruments», США) с использованием программного обеспечения WinWCP v5.x («University of Strathclyde», Великобритания).

Для каждого среза рассчитывали амплитуду пресинаптического популяционного спайка (прПСП, fiber volley) и пПСП (рис. 1, б). Измерение соотношения вход/выход (input/output) проводили при помощи стимуляции с возрастающей силой тока в диапазоне 25–200 мкА

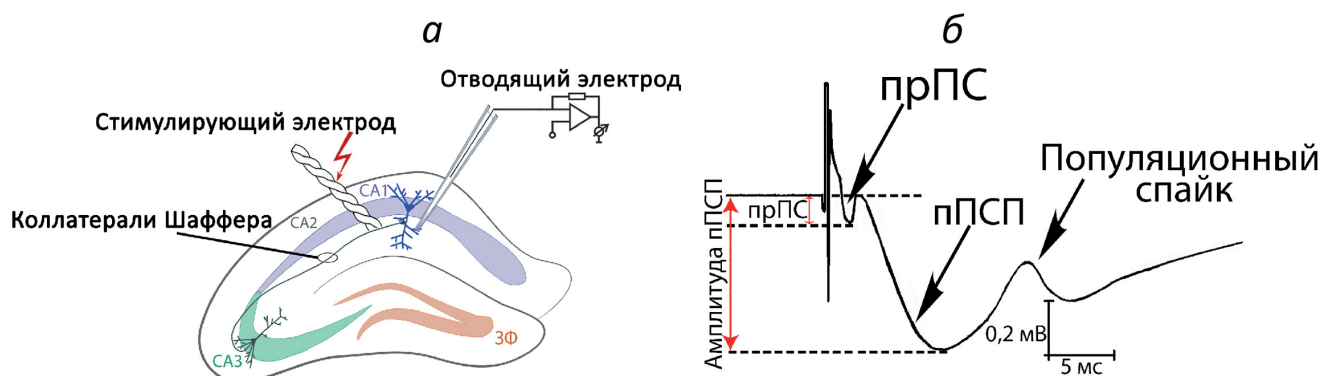


Рис. 1. Методика регистрации полевых потенциалов. а — Схема расположения электродов в срезах гиппокампа. б — Схема регистрируемого полевого ответа с указанием регистрируемых параметров; прПСП — пресинаптический популяционный спайк; пПСП — полевой постсинаптический потенциал

с шагом в 25 мкА. Строили зависимость вход/выход, которая представляет собой передаточную функцию между пресинаптическими потенциалами действия и ответом на постсинаптических мембранах. Эффективность синаптической нейротрансмиссии определяли по максимальному наклону кривой вход/выход, который находили путем аппроксимации функцией Гомперца [29].

Оценку величины кратковременной синаптической пластичности проводили методом парной стимуляции с возрастающими межстимульными интервалами 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500 мс. Величину пластичности рассчитывали, как отношение амплитуды второго пПСП к первому для каждого интервала стимулов.

Запись спонтанных возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) на пирамидных нейронах гиппокампа производили методом патч-клампа в режиме «целая клетка» при потенциале покоя в течение 10 мин. Использовали стеклянные микроэлектроды с входным сопротивлением 3–5 МОм. Электрод заполняли раствором следующего состава (в мМ): 114 глюконат калия; 6 KCl; 10 NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота); 0,2 EGTA (этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота); 4 АТР-Mg; 0,3 GTP. Поиск и анализ ВПСП проводился автоматически при помощи предварительно созданного шаблона в программе Clampfit 10.4.2.0 (Molecular Devices), ошибочно отобранные программой ВПСП исключали при визуальной оценке результатов.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Индукцию судорог вызывали у крыс в возрасте 6–7 недель. Для анализа экспрессии генов, кодирующих GluA1 (*Gria1*) и GluA2 (*Gria2*) субъединицы AMPA-рецепторов, крыс декапитировали на 3, 7 и 60 день после индукции судорог. Выделение дорзальной области гиппокампа было выполнено при помощи замораживающего микроножа OTF5000 («Bright Instruments», Великобритания). Тотальную РНК из образцов выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Перед обратной транскрипцией образцы РНК обрабатывали RQ1 DNase («Promega», США). Затем РНК осаждали с помощью раствора LiCl. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop Lite («Thermo Fisher Scientific», США).

кДНК синтезировали из 2 мкг тотальной РНК с использованием олиго-dT (1 мкг), 9-мерных случайных (0,5 мкг) праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и обратной транскриптазы М-MLV («Promega»). Реакцию проводили согласно инструкции производителя.

Полученные образцы кДНК разбавляли в 10 раз перед проведением ПЦР. ПЦР проводили в общем объеме 6 мкл с 0,8 мкл кДНК. Для реакции использовали 0,5 ед. TaqM-полимеразы («Алкор-Био», Россия). Специфические зонды, прямые и обратные праймеры («ДНК-Синтез») приведены в табл. 2. ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX384 Real-Time System («Bio-Rad», США).

ПЦР для генов домашнего хозяйства были проведены в мультиплексах (*Actb* + *Gapdh* + *B2m*, *Rpl13a* + *Ppia* + *Sdha* и *Hprt1* + *Pgk1* + *Ywhaz*) в соответствии с протоколом, описанным ранее [30]. Анализ, выполненный с использованием онлайн-инструмента RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>), выявил, что из перечисленных генов домашнего хозяйства *Pgk1*, *Ywhaz* и *Gapdh* экспрессируются наиболее стабильно. Относительная экспрессия генов *Gria1* и *Gria2* была подсчитана с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [31]. Нормализацию данных проводили с использованием среднего геометрического значений Ct генов *Pgk1*, *Ywhaz* и *Gapdh*.

Метод максимального электрошока (МЭШ). Предрасположенность к судорогам у животных исследовали с помощью МЭШ через 2,5 месяца после ЭС. Ток подавался через ушные электроды с использованием генератора импульсов ECT Unit 57800 («Ugo Basile», Италия). Использовали силу тока в диапазоне 12–100 мА с интервалами 0,1 логарифмической шкалы, частота импульсов – 200 Гц, длительность одиночного импульса – 0,9 мс, длительность подачи тока – 0,8 с. У каждого животного определяли минимальное значение тока, при котором наблюдались тонические судороги с экстензией задних конечностей. В первый день животное получало электрошок средней силы (40 мА). Если тонические судороги с экстензией задних конечностей не развивались, то силу тока увеличивали. Если при 40 мА тонические судороги развивались, то силу тока уменьшали. Повторные эксперименты проводили через 2–3 дня.

Статистическая обработка данных. Достоверность различий средних в двух выборках оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Влияние силы стимулирующего тока на величину полевых ответов, а также сравнение пПСП в разных группах проверяли с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями с последующим использованием апостериорного критерия Тьюки. Для сравнения относительной экспрессии генов использовали двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака. Данные в тексте

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов для ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательности праймеров и зондов (5'→3')	Ссылка
<i>Actb</i> NM_031144	F: TGTCACCAACTGGGACGATA R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA Зонд: FAM-CGTGTGGCCCCTGAGGAGCAC-BHQ1	[32] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Gapdh</i> NM_017008	F: TGCACCACCAACTGCTTAG R: GGATGCAGGGATGATGTTT Зонд: R6G-ATCACGCCACAGCTTTCCAGAGGG-BHQ2	[33]
<i>B2m</i> NM_012512	F: TGCCATTTCAGAAAACCTCCCC R: GAGGAAGTTGGGCTTCCCATTT Зонд: ROX-ATTCAAGTGTACTCTCGCCATCCACCG-BHQ1	[34]
<i>Rpl13a</i> NM_173340	F: GGATCCCTCCACCCTATGACA R: CTGGTACTTCCACCCGACCTC Зонд: FAM-CTGCCCTCAAGGTTGTGCGGCT-BHQ1	[35] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Sdha</i> NM_130428	F: AGACGTTTGACAGGGGAATG R: TCATCAATCCGCACCTTGTA Зонд: R6G-ACCTGGTGGAGACGCTGGAGCT-BHQ2	[36] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Ppia</i> NM_017101	F: AGGATTCATGTGCCAGGGTG R: CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA Зонд: ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA-BHQ1	[26]
<i>Hprt1</i> NM_012583	F: TCCTCAGACCGCTTTTCCCGC R: TCATCATCACTAATCACGACGCTGG Зонд: FAM-CCGACCGGTTCTGTCTATGTCGACCCT-BHQ1	[37] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Pgk1</i> NM_053291	F: ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC R: AGCCACAGCCTCAGCATATTC Зонд: R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA-BHQ2	[38] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Ywhaz</i> NM_013011	F: GATGAAGCCATTGCTGAACCTG R: GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC Зонд: ROX-TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC-BHQ1	[38] (праймеры); [30] (зонд)
<i>Gria1</i> NM_031608	F: TCAGAACGCCTCAACGCC R: TGTAGTGGTACCCGATGCCA Зонд: ROX-TCCTGGGCCAGATCGTGAAGCTAGAAAA-BHQ1	[39]
<i>Gria2</i> NM_017261	F: CAGTGCATTTCTGGGTAGGGA R: TGCGAAACTGTTGGCTACCT Зонд: FAM-TCGGAGTTCAGACTGACACCCCA-BHQ1	[39]

и на рисунках приведены как среднее со стандартной ошибкой среднего, если не указано обратного.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Возможные изменения характеристик глутаматергической передачи в гиппокампе крыс были проанализированы на нескольких структурных уровнях: молекулярном (экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов), клеточном (исследование синаптической нейротрансмиссии и вероятности выброса глутамата клетками) и на целом животном (МЭШ-тест).

Относительная экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов снижена в латентной, но не в хронической фазе. Так как амплитуда синаптических возбуждающих ответов в основном определяется AMPA-рецепторами, то мы проанализировали, изменяется ли уровень экспрессии генов, кодирующих GluA1 (*Gria1*) и GluA2 (*Gria2*) субъединицы AMPA-рецепторов (рис. 2).

Мы выявили снижение экспрессии обоих генов на 3-й день после ЭС. Продукция мРНК *Gria2* остается сниженной до 7-го дня после пилокарпин-индуцированных судорог, но не отличается от контрольных значений в хроническую фазу (рис. 2, б). Изменений

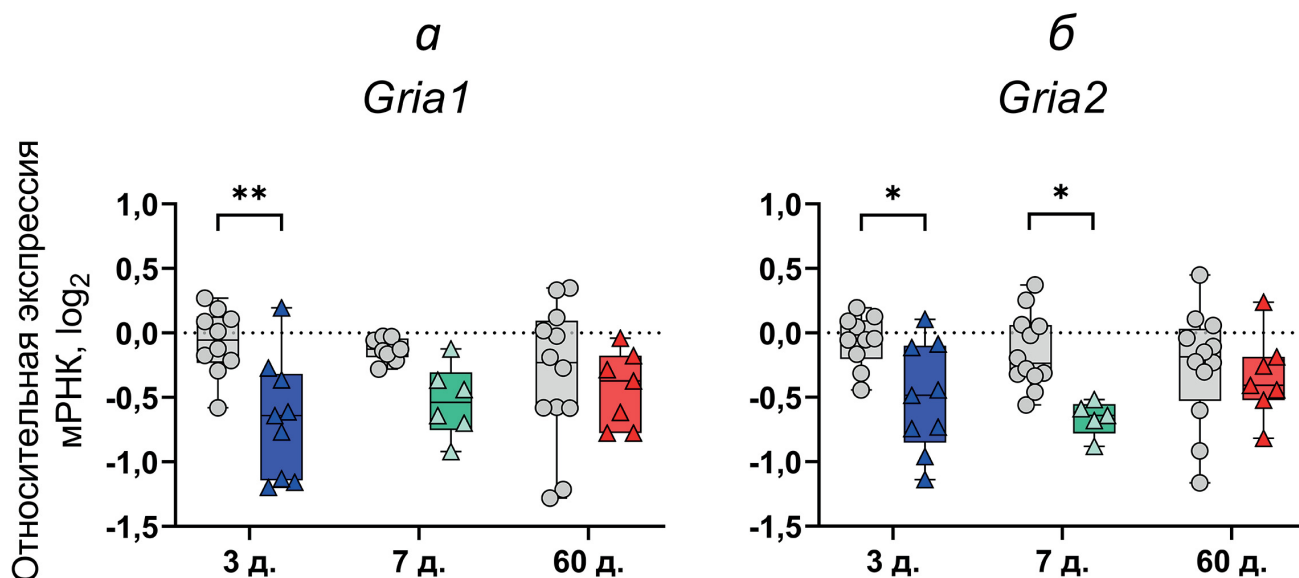


Рис. 2. Относительная экспрессия генов *Gria1* (а) и *Gria2* (б) в дорзальной области гиппокампа крыс. Исследования проводились на 3-й и 7-й дни после индукции ЭС (латентная фаза модели), а также на 60-й день (хроническая фаза модели). Контрольная группа показана серым цветом. Данные представлены в виде индивидуальных значений (кружки и треугольники) с минимальным и максимальным значениями (планки ошибок), медианой выборки (горизонтальная линия), а также первым и третьим квартилями (прямоугольники). Число животных в группах: 1) эпилептическая группа: 3-й день ($n = 9$), 7-й день ($n = 6$), 60-й день ($n = 7$); 2) контрольная группа: 3-й день ($n = 10$), 7-й день ($n = 11$), 60-й день ($n = 12$); д. — количество дней после ЭС. Двухфакторный дисперсионный анализ: *Gria1* — $F_{1,47}$ (фактор судорог) = 12,4, $p = 0,001$; *Gria2* — $F_{1,49}$ (фактор судорог) = 13,4, $p < 0,001$. Значимые различия между группами рассчитаны с помощью апостериорного теста Сидака — * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

экспрессии *Gria1* не выявлено ни на 7-й день, ни в хроническую фазу (рис. 2, а).

Глутаматергическая синаптическая нейротрансмиссия снижена в разные периоды литий-пилокарпиновой модели. Патологические изменения в нейронных связях гиппокампа ведут к изменениям базовой синаптической трансмиссии. Поэтому мы исследовали, как изменяется базовый уровень возбуждающей (глутаматергической) синаптической нейротрансмиссии в синапсах СА3–СА1 пирамидных нейронов гиппокампа у крыс в острую, латентную и хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели ВЭ. Для этого мы построили зависимость амплитуды пПСП и прПС от силы внеклеточной стимуляции, а также вход/выход-зависимости (рис. 3). Из-за повышенной возбудимости нейронных сетей у крыс в различные фазы после ЭС может изменяться не только амплитуда, но и форма пПСП, что согласуется с результатами, полученными в модели эпилептических судорог, вызванных пентилентетразолом [29].

В острой фазе модели амплитуда пПСП снижена по сравнению с контролем, особенно при большой силе стимуляции ($F_{1,448} = 7,5$; $p < 0,01$; рис. 3, а). Изменений амплитуды прПС не было выявлено ($F_{1,441} = 0,67$; $p = 0,42$; рис. 3, а). Анализ вход/выход-зависимости показал значительное снижение уровня синаптической

нейротрансмиссии на 1-й день после ЭС ($t = 2,77$; $p < 0,01$; рис. 3, з).

В латентной фазе модели не было выявлено отличий амплитуд пПСП ни на 3-й, ни на 7-й день ($F_{2,602} = 1,70$; $p = 0,18$; рис. 3, б). Однако было обнаружено снижение прПС на 3-й день в интервале стимуляции 125–200 мкА по сравнению с контрольной группой ($F_{2,567} = 8,3$; $p < 0,001$; рис. 3, б). Соотношение вход/выход статистически значимо снижается только к 7-му дню после перенесенного ЭС ($F_{2,76} = 3,58$; $p < 0,05$; рис. 3, д).

В хронической фазе наблюдается значительное снижение амплитуды пПСП ($F_{1,707} = 17,0$; $p < 0,001$; рис. 3, в) в широком диапазоне интервалов стимуляции (75–200 мкА), однако изменения амплитуды прПС, выявленные с помощью дисперсионного анализа ($F_{1,637} = 4,2$; $p < 0,05$; рис. 3, в), не достигали уровня значимости при проверке апостериорными тестами. Также в этот период происходит значительное ослабление синаптической нейротрансмиссии ($t = 2,19$; $p < 0,05$; рис. 3, е).

Вероятность выброса глутамата в синапсах области СА1 гиппокампа изменена в хронической фазе модели эпилепсии. Изменение величины синаптической нейротрансмиссии может быть связано с изменением вероятности выброса глутамата в коллатералях Шаффера. Для оценки возможных изменений вероятности

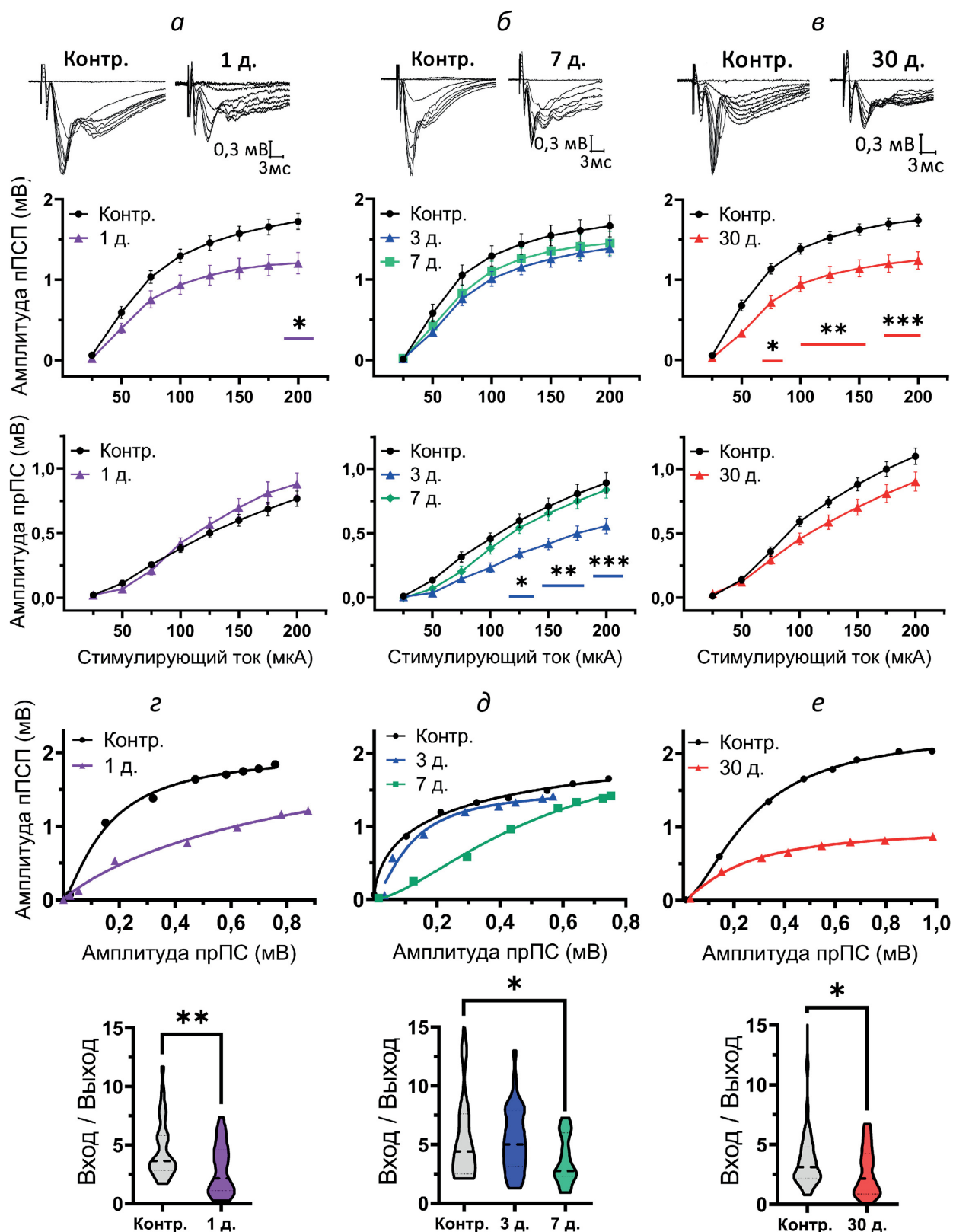


Рис. 3. Репрезентативные примеры записей (сверху), амплитуды пПСП и амплитуды прПС в ответ на стимуляцию (снизу) (а–в). Примеры вход/выход-отношений между амплитудами пПСП и прПС, аппроксимированные сигмоидальной функцией Гомперца (сверху), и сравнение их максимальных наклонов (снизу) (г–е). На графиках сравнения соотношения вход/выход толстой пунктирной линией указаны медианы, тонкой пунктирной линией – квартили. Число срезов в группах: 1) эпилептическая группа: 1-й день ($n = 39$), 3-й день ($n = 41$), 7-й день ($n = 39$), 30-й день ($n = 41$); 2) контрольная группа: 1-й день ($n = 35$), 7-й день ($n = 24$), 30-й день ($n = 41$). прПС – пресинаптический популяционный спайк; Контр. – контроль; д. – количество дней после ЭС. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (апостериорный критерий Тьюки – для панелей а, б, в, д; t-тест – для панелей г и е)

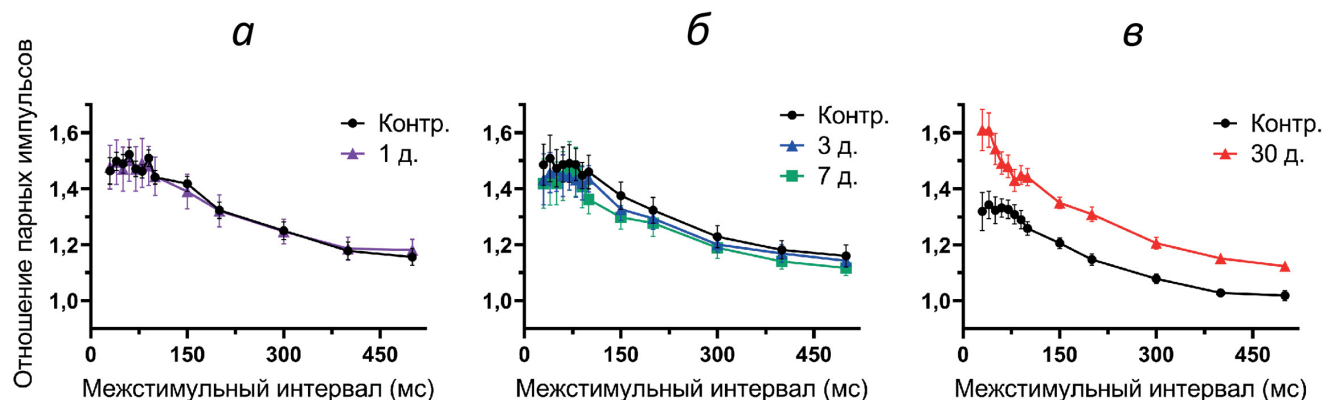


Рис. 4. Кратковременная синаптическая пластичность не изменяется в срезах гиппокампа крыс, перенесших ЭС. а–в – Графики зависимости отношения парных импульсов от величины межстимульного интервала в острую, латентную и хроническую фазы соответственно. Число срезов в группах: 1) эпилептическая группа: острая фаза – 1-й день ($n = 10$); латентная фаза – 3-й день ($n = 6$), 7-й день ($n = 10$); хроническая фаза – 30-й день ($n = 20$); 2) контрольная группа: 1-й день ($n = 9$), 7-й день ($n = 7$), 30-й день ($n = 9$); д. – количество дней после ЭС

выброса медиатора часто используют сравнение отношений амплитуд синаптических ответов при подаче парных стимулов [40]. Поэтому мы измерили отношения амплитуд ответов (величину кратковременной фасилитации) при подаче парных стимулов с разным интервалом в диапазоне 30–500 мс.

В острой и латентной фазах достоверных различий выявлено не было (острая фаза – $F_{1,204} = 0,47$; $p = 0,93$; рис. 4, а; латентная фаза – $F_{2,240} = 0,18$; $p = 0,84$; рис. 4, б). В хронической фазе дисперсионный анализ выявляет различия между контрольной и ВЭ-группами ($F_{1,324} = 13,1$; $p < 0,01$; рис. 4, в), однако апостериорный тест Тьюки не подтвердил значимость различий ни для одного из временных интервалов.

При эпилепсии могут происходить изменения в работе пресинапса [15], включая увеличение числа везикул, готовых к выбросу в пресинаптических терминалях [21], что может проявляться в увеличении вероятности спонтанного выброса медиатора и увеличении коэффициента фасилитации. Поэтому мы проанализировали частоту и амплитуду спонтанных ВПСР в СА1 пирамидных нейронах гиппокампа в хронической фазе модели. Мы регистрировали спонтанную активность пирамидных нейронов поля СА1 при потенциале покоя. На рис. 5, а представлены репрезентативные примеры регистраций, на которых отмечены ВПСР. У нейронов гиппокампа крыс с ВЭ частота ВПСР была выше на 118%, чем в контрольной группе ($t = 2,5$; $p = 0,02$; рис. 5, б), однако амплитуда ВПСР не различалась ($t = 0,60$; $p = 0,56$; рис. 5, в) и составляла $0,72 \pm 0,20$ мВ у контрольных животных и $0,79 \pm 0,21$ мВ – у крыс с ВЭ. Следует отметить, что на рис. 5, б для крыс экспериментальной группы 4 точки на частоте больше 2 Гц получены от разных животных.

Результаты этого эксперимента показывают, что вероятность выброса медиатора выше в эпилептической группе, и это согласуется с данными, полученными другими авторами в каинатной модели эпилепсии [21]. Однако в пилокарпиновой модели Owen et al. [41] наблюдали увеличение частоты миниатюрных ВПСР

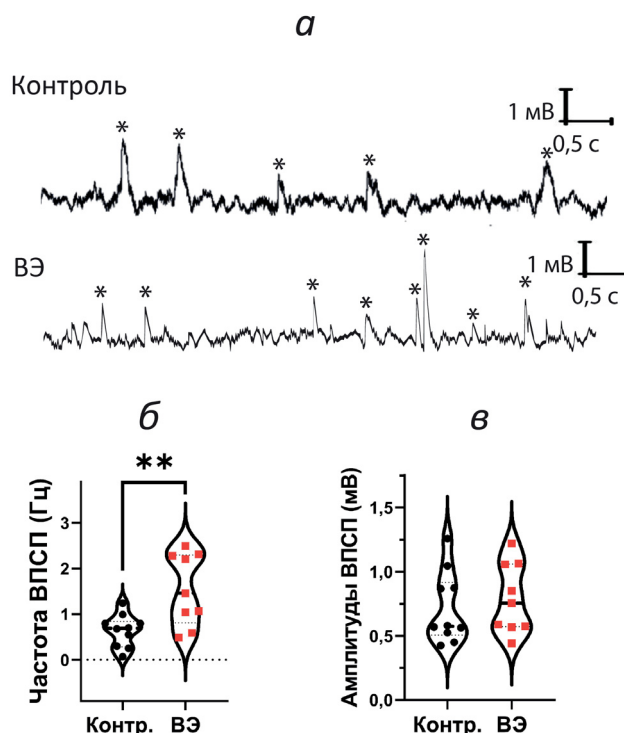


Рис. 5. Частота ВПСР снижена, а амплитуда остается неизменной в пирамидных нейронах гиппокампа крыс с ВЭ. а – Репрезентативные записи ответов нейронов при потенциале покоя, ВПСР отмечены звездочками. Частота (б) и амплитуда (в) спонтанных ВПСР в двух группах. Число срезов в группах: 1) эпилептическая группа: 35-й день ($n = 9$); 2) контрольная группа: 35-й день ($n = 10$); Контр. – контроль; ВЭ – группа крыс с височной эпилепсией; t -тест – ** $p < 0,01$

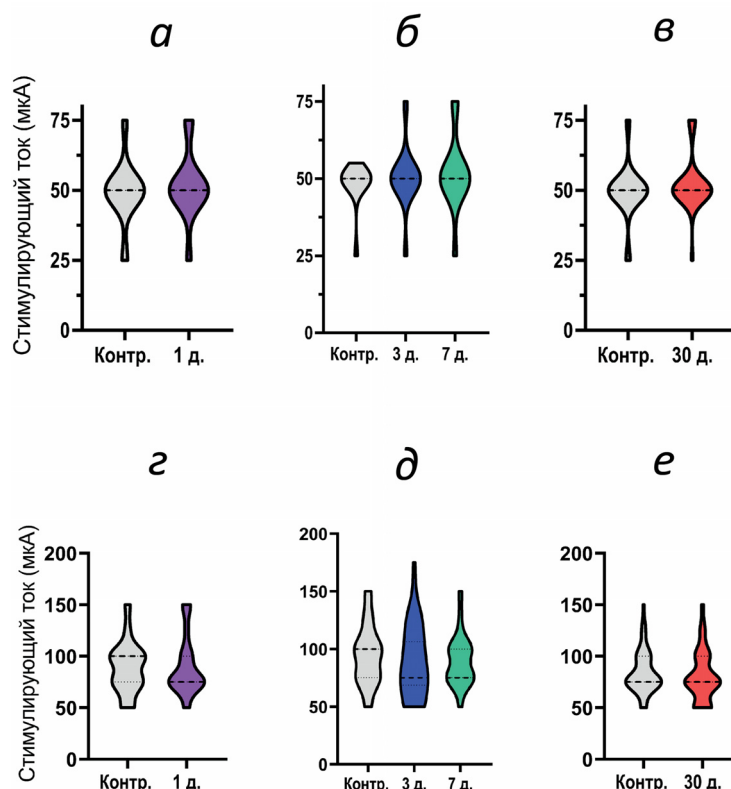


Рис. 6. Пороговые токи, вызывающие пПСП (а–в) и ПС (г–е) не изменяются в острой (а, г), латентной (б, д) и хронической (в, е) фазах литий-пилокарпиновой модели ВЭ. Число срезов в группах: 1) epileptическая группа: острая фаза – 1-й день ($n = 39$); латентная фаза – 3-й день ($n = 42$), 7-й день ($n = 39$); хроническая фаза – 30-й день ($n = 74$); 2) контрольная группа: 1-й день ($n = 35$), 7-й день ($n = 25$), 30-й день ($n = 59$). Контр. – контроль; д. – число дней после ЭС. Апостериорный критерий Тьюки использован для сравнения данных на панелях б, д; t -тест – для а, в, г и е

в более поздние сроки модели (через 80–110 дней), тогда как через 20–60 дней частота событий между контрольной и epileptической группой еще не различалась. Пороги полевых постсинаптических потенциалов (пПСП) и популяционных спайков (ПС) не изменены у крыс с ВЭ.

При epilepsии вероятность синхронизации и реверберации нервных импульсов в нейронных сетях возрастает. Соответственно, более слабое синаптическое возбуждение может приводить к генерации потенциалов действия. Так как мы выявили ослабление возбуждающей синаптической передачи в гиппокампе экспериментальных крыс (рис. 3), то решили проверить изменяются ли пороги возникновения пПСП и ПС в нейронах CA1. Мы не выявили достоверных различий для порогов возникновения пПСП ни в одном из исследуемых периодов (острая фаза – $t = 0,97$; $p = 0,34$; рис. 6, а; латентная фаза – $F_{2,102} = 1,11$; $p = 0,33$; рис. 6, б; хроническая фаза – $t = 1,83$; $p = 0,07$; рис. 6, в); ни для порогов генерации ПС (острая фаза – $t = -0,19$; $p = 0,85$; рис. 6, г; латентная фаза – $F_{2,102} = 0,48$; $p = 0,62$; рис. 6, д; хроническая фаза – $t = 0,9$; $p = 0,37$; рис. 6, е).

Таким образом, несмотря на снижение эффективности возбуждающей синаптической передачи, сила внеклеточной стимуляции, необходимая для генерации потенциалов действия в пирамидных нейронах области CA1, осталась прежней.

У крыс с височной epilepsией снижен порог развития экстензии задних конечностей в МЭШ-тесте. Для исследования предрасположенности к судорогам провели тестирование МЭШ у крыс в хронической фазе модели и у контрольных животных того же возраста (рис. 7, а). У крыс с ВЭ выявили значительное снижение порога появления экстензии задних конечностей ($t = 2,4$; $p < 0,05$; рис. 7, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших экспериментов выявили ряд особенностей в функционировании глутаматергической передачи в гиппокампе крыс в разные фазы литий-пилокарпиновой модели ВЭ по сравнению с контролем. Часть изменений носит компенсаторный характер и направлена на снижение уровня возбуждения

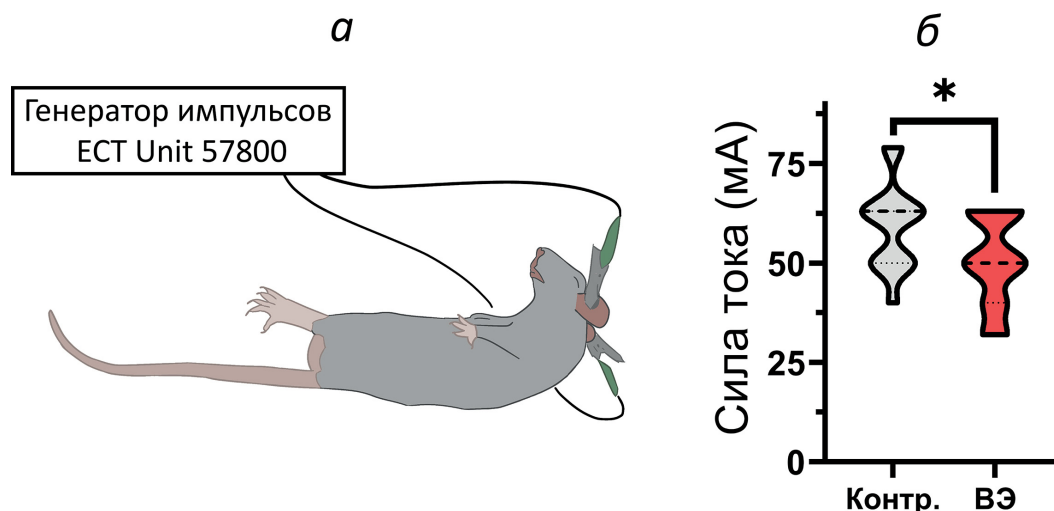


Рис. 7. Метод МЭШ. *а* – Схематическое изображение крысы с экстензией задних конечностей (тонические судороги), вызванные подачей электрического тока через ушные электроды. *б* – Пороговые токи, необходимые для экстензии задних конечностей у крысы. Число животных в группах: 1) эпилептическая группа: 50-й день ($n = 21$); 2) контрольная группа: 50-й день ($n = 15$). Контр. – контроль; ВЭ – группа крыс с ВЭ. Непарный t -тест – * $p < 0,05$

нейронных сетей. В частности, мы выявили ослабление базового уровня синаптической передачи в срезах гиппокампа крыс. Однако другие изменения, такие как повышение частоты спонтанных ВПСП, могут свидетельствовать о патологически высокой фоновой активации глутаматергической системы. На уровне целого организма это проявляется в снижении порога возникновения судорог, вызванных МЭШ.

В острую фазу модели нарушения синаптической передачи могут быть связаны с тем, что после ЭС у части животных наблюдается почти полная гибель нейронов области СА1 гиппокампа [18], и, скорее всего, именно эти животные часто погибают в первые несколько суток после ЭС. С этим может быть связано почти бимодальное распределение значений наклона функции вход/выход (рис. 3, *г*). При развитии эпилепсии (начиная с 7-го дня) эффективность возбуждающей синаптической передачи снижена, что может являться компенсаторной реакцией, направленной на ослабление передачи возбуждения в нейронных сетях гиппокампа, либо это может быть проявлением продолжающейся нейродегенерации в гиппокампе [19]. В предыдущих наших работах мы обнаружили снижение уровня долговременной потенциации в поле СА1 в латентную и хроническую фазы, что также может быть вызвано выявленным снижением возбуждающей нейротрансмиссии [18, 20].

Другим важным фактором, определяющим свойства возбуждающей синаптической передачи, является число и субъединичный состав AMPA-рецепторов. Известно, что уменьшение экспрессии GluA2-субъединицы может вести к

увеличению доли AMPA-рецепторов, лишенных этой субъединицы и имеющих особые биофизические свойства и кальциевую проницаемость [42]. В данной работе мы выявили снижение продукции мРНК генов субъединиц AMPA-рецепторов *Gria1* и *Gria2* в дорзальной области гиппокампа крыс в латентной фазе литий-пилокарпиновой модели, что согласуется с ранее полученными нами результатами в коре мозга с помощью электрофизиологических методов [26]. Ослабление экспрессии GluA2-субъединицы в гиппокампе и височной коре ведет к увеличению глутамат-опосредованного проникновения ионов Ca^{2+} в клетку и эксайтотоксичности, что, в свою очередь, может быть одним из факторов нейродегенерации и эпилептогенеза [24].

Другой причиной снижения эффективности синаптической передачи могут быть изменения в пресинапсе. Для оценки вероятности выброса медиатора изучают кратковременную синаптическую пластичность и частоту спонтанных ВПСП [40]. В острой и латентной фазах свойства кратковременной синаптической пластичности экспериментальных животных практически не отличались от контроля. В хронической фазе литий-пилокарпиновой модели мы выявили тенденцию к ослаблению фасилитации и увеличение частоты ВПСП, что может быть связано с увеличением числа везикул, готовых к выбросу в пресинаптических терминалях, как было показано в каинатной модели эпилепсии [21]. Интересно, что в пентилентетразоловой модели, в которой, в отличие от пилокарпиновой и каинатной модели, хронической эпилепсии не развивается, наблюдается

снижение вероятности выброса глутамата пресинапсами, что может оказывать противоэпилептогенный эффект [29].

В ходе данной работы при использовании полевых отведений на переживающих срезах гиппокампа не было выявлено изменений в порогах генерации пПСП и ПС у экспериментальной группы животных. Однако у крыс с ВЭ в тесте МЭШ порог генерации тонических судорог был значительно снижен по сравнению с контрольными животными. Этот результат противоположен тому, что было получено нами ранее в пентилентетразоловой модели, где, наоборот, происходило увеличение порога тока в тесте МЭШ [29]. Следует подчеркнуть, что после ЭС, вызванного пентилентетразолом, эпилепсия не развивается, в отличие от литий-пилокарпиновой модели.

Снижение порога генерации судорожной активности, вероятно, также обусловлено нейродегенерацией в гиппокампе как в острую, так и хроническую фазы модели ВЭ [18, 19]. В эти периоды выявлена потеря не только возбуждающих нейронов, но и избирательная гибель интернейронов определенных классов в разных областях гиппокампа [43]. Например, в области СА1 гиппокампа наблюдается избирательная гибель парвальбуминовых и кальретиновых интернейронов, а в области СА3 — глобальное снижение ГАМКергической нейротрансмиссии, что ведет к нарушению баланса торможения и возбуждения [43]. В данной работе мы сфокусировались на патологических изменениях только в гиппокампе, как наиболее уязвимой структуре мозга в данной модели ВЭ, однако в литий-пилокарпиновой модели различные гистопатологические изменения выявлены также в ряде областей коры больших полушарий, амигдале, таламусе, черной субстанции и др. [13]. Эти струк-

туры мозга вовлечены в формирование и поддержание судорог, поэтому нельзя исключать их вклад в снижение порога генерации судорог.

Полученные нами результаты свидетельствуют о комплексе изменений в глутаматергической системе гиппокампа после ЭС, которые включают в себя изменения субъединичного состава АМРА-рецепторов в латентный период модели, высокую фоновую активацию глутаматергической системы при снижении эффективности синаптической передачи в хроническую фазу модели. Эти данные позволяют лучше понять механизмы генерации спонтанных рецидивирующих судорог и могут помочь в разработке рационально обоснованной терапии предотвращения эпилептогенеза и развития эпилепсии.

Вклад авторов. Т.Ю. Постникова, А.В. Зайцев — концепция и руководство работой; Т.Ю. Постникова, Г.П. Диеспилов, А.А. Коваленко, А.В. Грифлюк — обработка и проведение экспериментов; Т.Ю. Постникова, А.А. Коваленко — анализ результатов и статистическая обработка данных; Г.П. Диеспилов, А.В. Грифлюк, А.А. Коваленко — написание текста; Т.Ю. Постникова, А.В. Зайцев — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00131).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все проводимые исследования выполнялись в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, действующими в ИЭФБ РАН и утвержденными правовыми актами РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fattorusso, A., Matricardi, S., Mencaroni, E., Dell'Isola, G. B., Di Cara, G., Striano, P., and Verrotti, A. (2021) The pharmaco-resistant epilepsy: an overview on existent and new emerging therapies, *Front. Neurol.*, **12**, 1030, doi: 10.3389/FNEUR.2021.674483.
2. Chin, J. H., and Vora, N. (2014) The global burden of neurologic diseases, *J. Neurol.*, **83**, 349-351, doi: 10.1212/WNL.0000000000000610.
3. Fordington, S., and Manford, M. (2020) A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury, *J. Neurol.*, **267**, 3105-3111, doi: 10.1007/s00415-020-09926-w.
4. Engel, J. J. (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*, **7**, 340-352, doi: 10.1177/107385840100700410.
5. Herman, S. T. (2002) Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis, *J. Neurol.*, **59**, S21-S26, doi: 10.1212/wnl.59.9_suppl_5.s21.
6. Pitkänen, A., and Lukasiuk, K. (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets, *Lancet Neurol.*, **10**, 173-186, doi: 10.1016/S1474-4422(10)70310-0.
7. Goldberg, E. M., and Coulter, D. A. (2013) Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural

- circuit dysfunction, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 337-349, doi: 10.1038/nrn3482.
8. Thom, M. (2014) Review: hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **40**, 520-543, doi: 10.1111/nan.12150.
 9. Bliss, T. V. P., and Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, **361**, 31-39, doi: 10.1038/361031a0.
 10. Titiz, A. S., Mahoney, J. M., Testorf, M. E., Holmes, G. L., and Scott, R. C. (2014) Cognitive impairment in temporal lobe epilepsy: role of online and offline processing of single cell information, *Hippocampus*, **24**, 1129-1145, doi: 10.1002/hipo.22297.
 11. Vlooswijk, M. C. G., Jansen, J. F. A., de Krom, M. C. F. T. M., Majoie, H. M., Hofman, P. A. M., Backes, W. H., and Aldenkamp, A. P. (2010) Functional MRI in chronic epilepsy: associations with cognitive impairment, *Lancet Neurol.*, **9**, 1018-1027, doi: 10.1016/S1474-4422(10)70180-0.
 12. Zavala-Tecuapetla, C., Cuellar-Herrera, M., and Luna-Munguia, H. (2020) Insights into potential targets for therapeutic intervention in epilepsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8573, doi: 10.3390/ijms21228573.
 13. Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. G., and Avoli, M. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *J. Neurosci. Methods*, **172**, 143-157, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
 14. Curia, G., Lucchi, C., Vinet, J., Gualtieri, F., Marinelli, C., Torsello, A., Costantino, L., and Biagini, G. (2014) Pathophysiogenesis of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr. Med. Chem.*, **21**, 663-688, doi: 10.2174/0929867320666131119152201.
 15. Zaitsev, A. V., Amakhin, D. V., Dyomina, A. V., Zakharova, M. V., Ergina, J. L., Postnikova, T. Y., Diespirov, G. P., and Magazanik, L. G. (2021) Synaptic dysfunction in epilepsy, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **57**, 542-563, doi: 10.1134/S002209302103008X.
 16. De Oliveira, D. L., Fischer, A., Jorge, R. S., Da Silva, M. C., Leite, M., Gonçalves, C. A., Quillfeldt, J. A., Souza, D. O., E Souza, T. M., and Wofchuk, S. (2008) Effects of early-life LiCl-Pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein, *Epilepsia*, **49**, 842-852, doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01484.x.
 17. Morimoto, K., Fahnestock, M., and Racine, R. J. (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain, *Prog. Neurobiol.*, **73**, 1-60, doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.03.009.
 18. Postnikova, T. Y., Diespirov, G. P., Amakhin, D. V., Vylekzhanina, E. N., Soboleva, E. B., and Zaitsev, A. V. (2021) Impairments of long-term synaptic plasticity in the hippocampus of young rats during the latent phase of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13355, doi: 10.3390/ijms222413355.
 19. Plata, A., Lebedeva, A., Denisov, P., Nosova, O., Postnikova, T. Y., Pimashkin, A., Brazhe, A., Zaitsev, A. V., Rusakov, D. A., and Semyanov, A. (2018) Astrocytic atrophy following status epilepticus parallels reduced Ca^{2+} activity and impaired synaptic plasticity in the rat hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 215, doi: 10.3389/fnmol.2018.00215.
 20. Kryukov, K. A., Kim, K. K., Magazanik, L. G., and Zaitsev, A. V. (2016) Status epilepticus alters hippocampal long-term synaptic potentiation in a rat lithium-pilocarpine model, *NeuroReport*, **27**, 1191-1195, doi: 10.1097/WNR.0000000000000656.
 21. Clarkson, C., Smeal, R. M., Hasenoehrl, M. G., White, J. A., Rubio, M. E., and Wilcox, K. S. (2020) Ultrastructural and functional changes at the tripartite synapse during epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy, *Exp. Neurol.*, **326**, 113196, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113196.
 22. Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., and Wasterlain, C. G. (2013) Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus, *Neurobiol. Dis.*, **54**, 225-238, doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.015.
 23. Amakhin, D. V., Soboleva, E. B., Ergina, J. L., Malkin, S. L., Chizhov, A. V., and Zaitsev, A. V. (2018) Seizure-induced potentiation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission in the entorhinal cortex, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 486, doi: 10.3389/fncel.2018.00486.
 24. Rajasekaran, K., Todorovic, M., and Kapur, J. (2012) Calcium-permeable AMPA receptors are expressed in a rodent model of status epilepticus, *Ann. Neurol.*, **72**, 91-102, doi: 10.1002/ana.23570.
 25. Amakhin, D. V., Malkin, S. L., Ergina, J. L., Kryukov, K. A., Veniaminova, E. A., Zubareva, O. E., and Zaitsev, A. V. (2017) Alterations in properties of glutamatergic transmission in the temporal cortex and hippocampus following pilocarpine-induced acute seizures in wistar rats, *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 264, doi: 10.3389/fncel.2017.00264.
 26. Malkin, S. L., Amakhin, D. V., Veniaminova, E. A., Kim, K. K., Zubareva, O. E., Magazanik, L. G., and Zaitsev, A. V. (2016) Changes of AMPA receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats, *Neuroscience*, **327**, 146-155, doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.024.
 27. Zubareva, O. E., Kovalenko, A. A., Kalemenev, S. V., Schwarz, A. P., Karyakin, V. B., and Zaitsev, A. V. (2018) Alterations in mRNA expression of glutamate receptor subunits and excitatory amino acid transporters following pilocarpine-induced seizures in rats, *Neurosci. Lett.*, **686**, 94-100, doi: 10.1016/j.neulet.2018.08.047.
 28. Racine, R. J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **32**, 281-294, doi: 10.1016/0013-4694(72)90177-0.

29. Postnikova, T. Y., Amakhin, D. V., Trofimova, A. M., Smolensky, I. V., and Zaitsev, A. V. (2019) Changes in functional properties of rat hippocampal neurons following pentylenetetrazole-induced status epilepticus, *Neuroscience*, **399**, 103-116, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.029.
30. Schwarz, A. P., Malygina, D. A., Kovalenko, A. A., Trofimov, A. N., and Zaitsev, A. V. (2020) Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples, *Mol. Cell. Probes*, **53**, 101611, doi: 10.1016/j.mcp.2020.101611.
31. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods*, **25**, 402-428, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
32. Bonefeld, B. E., Elfving, B., and Wegener, G. (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue, *Synapse*, **62**, 302-309, doi: 10.1002/syn.20496.
33. Lin, W., Burks, C. A., Hansen, D. R., Kinnamon, S. C., and Gilbertson, T. A. (2004) Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels, *J. Neurophysiol.*, **92**, 2909-2919, doi: 10.1152/jn.01198.2003.
34. Yamaguchi, M., Yamauchi, A., Nishimura, M., Ueda, N., and Naito, S. (2005) Soybean oil fat emulsion prevents cytochrome P450 mRNA down-regulation induced by fat-free overdose total parenteral nutrition in infant rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 143-147, doi: 10.1248/bpb.28.143.
35. Swijsen, A., Nelissen, K., Janssen, D., Rigo, J. M., and Hoogland, G. (2012) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures, *BMC Res. Notes*, **5**, 685, doi: 10.1186/1756-0500-5-685.
36. Pohjanvirta, R., Niittynen, M., Lindén, J., Boutros, P. C., Moffat, I. D., and Okey, A. B. (2006) Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats, *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 134-149, doi: 10.1016/j.cbi.2006.01.001.
37. Cook, N. L., Vink, R., Donkin, J. J., and van den Heuvel, C. (2009) Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury, *J. Neurosci. Res.*, **87**, 34-41, doi: 10.1002/jnr.21846.
38. Langnaese, K., John, R., Schweizer, H., Ebmeier, U., and Keilhoff, G. (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model, *BMC Mol. Biol.*, **9**, 53, doi: 10.1186/1471-2199-9-53.
39. Proudnikov, D., Yuferov, V., Zhou, Y., LaForge, K. S., Ho, A., and Kreek, M. J. (2003) Optimizing primer-probe design for fluorescent PCR, *J. Neurosci. Methods*, **123**, 31-45, doi: 10.1016/S0165-0270(02)00325-4.
40. Zucker, R. S., and Regehr, W. G. (2002) Short-term synaptic plasticity, *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 355-405, doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.
41. Owen, B., Bichler, E., and Benveniste, M. (2021) Excitatory synaptic transmission in hippocampal area CA1 is enhanced then reduced as chronic epilepsy progresses, *Neurobiol. Dis.*, **154**, 105343, doi: 10.1016/j.nbd.2021.105343.
42. Cull-Candy, S. G., and Farrant, M. (2021) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and their auxiliary subunits in synaptic plasticity and disease, *J. Physiol.*, **599**, 2655-2671, doi: 10.1113/jp279029.
43. Andre, V., Marescaux, C., Nehlig, A., and Fritschy, J. M. (2001) Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the at lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Hippocampus*, **11**, 452-468, doi: 10.1002/hipo.1060.

ALTERATIONS IN THE PROPERTIES OF THE GLUTAMATERGIC SYSTEM OF THE RAT HIPPOCAMPUS IN A LITHIUM-PILOCARPINE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

G. P. Diespirov, T. Y. Postnikova, A. V. Griflyuk, A. A. Kovalenko, and A. V. Zaitsev*

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
194223 St. Petersburg, Russia; e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru*

Status epilepticus (SE) triggers many pathological changes in the nervous system that are not yet fully understood and may lead to the development of epilepsy. In this work, we studied the effects of SE on the properties of excitatory glutamatergic transmission in the hippocampus in a rat model of lithium-pilocarpine temporal lobe epilepsy. Studies were performed 1 day (acute phase of the model), 3 and 7 days (latent phase), and 30 to 80 days (chronic phase) after SE. Using real-time PCR, we found that in the latent phase there is a decrease in gene expression of GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits, which may also be accompanied by an increased proportion of calcium-permeable AMPA receptors, which play an essential role in the pathogenesis of many CNS diseases. In acute brain slices we found a decrease in the efficiency of

excitatory synaptic neurotransmission in all phases of the model when recording field responses in the CA1 region of the hippocampus in response to stimulation of Schaffer collaterals by electric currents of different intensities. However, in the chronic phase we found an increase in the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic potentials, indicating an increased background activity of the glutamatergic system in epilepsy.

This is also supported by a decrease in the threshold of hind limb extension in the test of maximal electroshock seizure in rats with temporal lobe epilepsy compared to control animals. The results obtained indicate the presence of a number of functional alterations in the glutamatergic system related to epilepsy. These findings can be used to develop antiepileptogenic therapy.

Keywords: lithium-pilocarpine model of epilepsy, synapse, AMPA receptor, hippocampus, field postsynaptic potential, excitatory postsynaptic potential, maximal electroshock seizure

СИМПАТИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ И ЭНДОГЕННЫЕ КАТЕХОЛАМИНЫ В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ ПРЕПАРАТАХ МЫШЦ РАЗНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ

© 2023 С.А. Дмитриева¹, С.Г. Вологин², А.Н. Ценцевичский¹, А.Ю. Архипов¹, В.Ф. Хузахметова¹, Г.В. Сибгатуллина¹, Э.А. Бухараева^{1*}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, 420111 Казань, Россия; электронная почта: elbukhara@gmail.com

² Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, ФИЦ КазНЦ РАН, 420059 Казань, Россия

Поступила в редакцию 18.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 29.11.2022

Влияние симпатической нервной системы на работу сократительного аппарата скелетной мускулатуры в настоящее время не вызывает сомнений. Однако до недавнего времени не было доказательств того, что окончания симпатических нервов могут располагаться в непосредственной близости к нервно-мышечному синапсу. Также нет достоверных данных о том, какое количество эндогенных адреналина и норадреналина может содержаться вблизи синаптического контакта в скелетных мышцах. В настоящем исследовании на изолированных нервно-мышечных препаратах трёх скелетных мышц разного функционального профиля, содержащих мышечные волокна разных типов, с помощью флуоресцентного анализа, иммуногистохимического метода и иммуноферментного анализа показан близкий контакт между симпатическими и моторными холинергическими нервными окончаниями и наличие в этой области тирозингидроксилазы – фермента, участвующего в синтезе катехоламинов. Определены концентрации эндогенных адреналина и норадреналина в растворе, перфузирующем нервно-мышечный препарат, при разных режимах его функционирования. Сопоставлены эффекты блокаторов α - и β -адренорецепторов, оказываемые на процессы квантовой секреции ацетилхолина из двигательных нервных окончаний. Полученные данные представляют доказательства наличия эндогенных катехоламинов в области нервно-мышечного синапса и их роли в модуляции синаптической функции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нервно-мышечное соединение, симпатическая иннервация, тирозингидроксилаза, эндогенные катехоламины, блокаторы адренорецепторов.

DOI: 10.31857/S0320972523030065, EDN: QWOOGC

ВВЕДЕНИЕ

Почти 100 лет назад было открыто, что адреналин (АД) может усиливать сокращения скелетной мускулатуры [1, 2]. Последующие многочисленные исследования показали, что при возрастании сократительной активности мышцы, а также при стрессовых ситуациях в плазме крови человека и животных повышается уровень эндогенных катехоламинов: АД и норадреналина (НА) [3–5]. Увеличение сократительной способности скелетной мускулатуры связывали с воздействием эндогенных катехоламинов на свойства мембраны мышеч-

ных волокон [6, 7]. Относительно недавно с помощью современных методов иммунофлуоресцентной микроскопии и маркеров тирозингидроксилазы, фермента, участвующего в синтезе катехоламинов, было показано, что в некоторых препаратах скелетных мышц, таких как диафрагмальная мышца и длинный разгибатель пальца, варикозы симпатических нервов находятся в непосредственной близости от нервно-мышечного контакта [8, 9]. Многочисленные данные свидетельствуют о влиянии экзогенных активаторов адренорецепторов (АДР) на нервно-мышечные соединения в скелетных мышцах [8, 10–14]. Тесный контакт

Принятые сокращения: АД – адреналин; АДР – адренорецепторы; НА – норадреналин; НМП – нервно-мышечный препарат; m. LAL – мышца *levator auris longus*; m. SOL – мышца *soleus*, m. DIA – диафрагма.

* Адресат для корреспонденции.

между тирозингидроксилазой, ферментом, участвующим в синтезе НА [15], АДР и холин-ергическим нервно-мышечным синапсом в передней большеберцовой мышце, камбаловидной мышце и поднимателе уха свидетельствует о возможности участия эндогенных катехоламинов в регуляции синаптических функций [8, 9]. Ранее с помощью вестерн-блота мы показали, что в нервно-мышечных препаратах (НМП) диафрагмы мыши присутствуют АДР подтипов $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$ и $\beta 1$ [16, 17]. Активация разных подтипов АДР с помощью соответствующих специфических агонистов приводила к различным изменениям работы синаптического аппарата в синапсах мышц разного функционального профиля, содержащих мышечные волокна разных типов. Так, в НМП диафрагмы, которая содержит мышечные волокна как «быстрого», так и «медленного» типа, активация $\alpha 2$ -АДР приводила к снижению интенсивности квантовой секреции и повышению степени не-синхронности выделения квантов ацетилхолина [16, 17]. В НМП мышцы *levator auris longus* (m. LAL), относящейся к «быстрому» типу, агонист $\beta 2$ -АДР вызывал повышение количества освобождаемых квантов нейромедиатора и гиперполяризацию мембраны мышечного волокна [18], в НМП «медленной» мышцы *soleus* (m. SOL) АД вызывал повышение уровня квантовой секреции и степени синхронности выделения квантов [19]. Эти данные, а также результаты других исследований [20–24] свидетельствуют о том, что изменение активности АДР оказывает модулирующее влияние на работу синаптического аппарата. В связи с этим возникает вопрос: может ли в области синаптического контакта находиться какое-то количество эндогенных катехоламинов, которые могут выделяться из окончаний симпатических нервов и изменять функции НМП? Поэтому целью настоящего исследования явилось установление пространственного расположения симпатических нервов и холин-ергических окончаний двигательного нерва, выявление фермента тирозингидроксилазы в области синаптического контакта и определение концентраций АД и НА в растворе, омывающем НМП мышц разного функционального профиля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

НМП, растворы. Исследования проводили на изолированных НМП лабораторных мышей линии balb/c (20–23 г, возраст 2–3 мес.) обоих полов, содержавшихся в условиях 12 ч света

и 12 ч темноты; вода и еда были предоставлены в свободном доступе. Все эксперименты проводились согласно протоколу ухода за животными и требованиям Директивы Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС, а также были одобрены локальным этическим комитетом Казанского медицинского университета (протокол № 10 от 20 декабря 2016 г.). После декапитации выделяли НМП из скелетных мышц разного функционального профиля, содержащих мышечные волокна разного типа – «быстрого» (*m. levator auris longus* – *n. facialis*, m. LAL), «медленного» (*m. soleus* – *n. tibialis*, m. SOL) и смешанного (*m. diaphragma* – *n. phrenicus*, m. DIA). После выделения НМП несколько раз тщательно отмывали от крови и помещали в экспериментальную ванночку объемом 3 мл, содержащую раствор Рингера для теплокровных животных следующего состава: 150 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 2 мМ CaCl₂; 1 мМ MgCl₂; 11 мМ глюкозы; 5 мМ HEPES; pH 7,2–7,4. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (+21 ± 2 °C).

Локализация симпатических нервов с помощью флуоресцентного маркера. Для визуализации симпатических нервов использовали флуоресцентный краситель FFN511 («Abscam», Великобритания), который является ложным нейромедиатором, не опосредующим физиологические эффекты и загружающимся в синаптические везикулы [25]. Для визуализации холин-ергического нервно-мышечного синапса использовали краситель FM1-43 (7 мкМ, «Thermo Fisher Scientific», Финляндия), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и затем захватывается посредством эндоцитоза в синаптическую везикулу, маркируя её [26, 27]. Загрузку красителя FM1-43 в НМП производили стимуляцией с частотой 20 Гц в течение 4 мин. После отмывки красителя НМП инкубировали с флуоресцентным ложным нейромедиатором FFN511 (10 мкМ) при стимуляции с частотой 2 Гц в течение 15 мин, а затем отмывали препарат бескальциевым раствором в течение 30 мин для удаления красителя с поверхности НМП. Флуоресценцию FFN511 детектировали при возбуждении УФ и эмиссионном фильтре 450–510 нм; для FM1-43, соответственно, при 480–535 нм. Для фиксирования и анализа изображений использовали микроскоп BX51WI («Olympus», Япония), оснащённый вращающимся диском, осветителем CoolLED pE-300white («CoolLED Ltd.», Великобритания) и sCMOS-камерой Dhyana 400BSI V2 («Tucsen», Китай) под управлением программ-

ного обеспечения Mosaic («Tucsen»). Область интереса ROI (region of interest) визуализировали с помощью объектива UPLANSapo 60× («Olympus») и двухканального обходного разделителя изображения Optosplit II («Cairn Research», Великобритания). Для анализа изображений использовали программу ImagePro («Media Cybernetics», США) [28].

Иммуногистохимическое окрашивание тирозингидроксилазы в НМП. НМП фиксировали 30 мин в 4%-ном (*m/v*) параформальдегиде («Sigma», США), приготовленном на 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,4 (PBS, «Sigma»). Затем их отмывали PBS в течение 15 мин, трижды меняя раствор, после чего инкубировали 30 мин в 0,5%-ном (*m/v*) Triton X-100 («Sigma»). Для блокирования неспецифических сайтов связывания антител препараты выдерживали в 5%-ной (*v/v*) нормальной ослиной сыворотке («Abscam») в течение 30 мин при комнатной температуре. Инкубацию с моноклональными первичными антителами к тирозингидроксилазе (1 : 200; «Millipore», США) производили в течение 15 ч при 4 °C в присутствии 1%-ного БСА. После промывки в 0,5%-ном Triton X-100 (3 раза по 10 мин) препараты инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa647 («Invitrogen», США), в разведении 2 : 200 и после очередной отмывки инкубировали с маркером ацетилхолиновых рецепторов тетраметилродамин- α -бунгаротоксином («Sigma») в концентрации 20 мкг/мл 30 мин в темноте при комнатной температуре. После завершающей отмывки препараты помещали на предметные стёкла и заключали в фиксирующий раствор «Surgipath SubX» («Leica Microsystems CMS GmbH», Германия). Флуоресценцию регистрировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 («Leica Microsystems CMS GmbH») при возбуждении аргоновым лазером с длиной волны возбуждения 633 нм и регистрации при 653–695 нм для Alexa647 и длиной волны возбуждения 514 нм и регистрации при 550–590 нм для тетраметилродамин- α -бунгаротоксина. Обработку полученных изображений проводили с помощью лицензионного программного пакета LASX («Leica Microsystems CMS GmbH»).

ИФА содержания катехоламинов. Для определения концентрации эндогенных АД и НА в НМП скелетных мышц с помощью ИФА [29] использовали образцы физиологического раствора, в котором находились НМП в контроле (30 мин), а также после стимуляции двигательного нерва в течение 10 мин с частотой, характерной для работы данного типа мышцы

в физиологических условиях [30]. Для НМП «медленной» *m. SOL* частота стимуляции была 20 Гц, для НМП «быстрой» *m. LAL* — 70 Гц, для НМП «смешанной» *m. DIA* — 50 Гц. Образцы раствора объёмом 1 мл забирали из экспериментальной ванночки, в которой находился НМП, затем немедленно фиксировали в жидком азоте в пробирках, содержащих 5 мМ ЭДТА в качестве консерванта, и хранили при температуре –80 °C до анализа содержания катехоламинов. Количество АД и НА определяли методом ИФА с помощью коммерческого набора CatCombi ELISA («IBL», Германия), который обладает высокой специфичностью и чувствительностью [31]. Экстракцию и концентрирование катехоламинов из раствора осуществляли на боронат-аффинном геле в присутствии буфера для экстракции в течение 30 мин при качании 900 об./мин. В лунки планшета, покрытого козьими антикроличьими антителами к одному из эпитопов АД и НА [29], добавляли свежеприготовленный раствор катехол-о-метилтрансферазы, вносили образцы и добавляли растворы кроличьих биотинилированных антител к другому эпитопу молекул АД или НА, планшет инкубировали при 600 об./мин в течение 2 ч. В ходе инкубации антиген образца связывается одним сайтом с антителами, адсорбированными на лунках планшета, а вторым — с биотинилированными антителами к другому эпитопу антигена. Затем в лунки планшета добавляли раствор свежеприготовленного ферментного конъюгата и инкубировали при комнатной температуре при 600 об./мин в течение 1 ч. В качестве ферментного конъюгата был использован стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, который связывается с биотинилированными антителами. Все несвязавшиеся компоненты реакций на каждом этапе экстракции и проведения ИФА удаляли из лунок планшета четырёхкратной промывкой буфером с помощью автоматического промывателя иммунологических планшетов HydroFlex («Tescan», Австрия). Затем планшеты инкубировали при 400 об./мин при комнатной температуре с раствором *p*-нитрофенил фосфата (pNPP), являющимся субстратом для щелочной фосфатазы и катализирующим превращение бесцветного pNPP в жёлтый пара-нитрофенол. Через 40 мин реакцию останавливали с помощью стоп-раствора, содержащего 1 М NaOH. Оптическую плотность растворов в лунках определяли при длине волны 405 нм с помощью многоканального фотометра Multiscan FC («Thermo Fisher Scientific»). Концентрацию катехоламинов рассчитывали

после измерения веса мышцы и нормирования на эту величину по калибровочной кривой, которую строили на основании прилагаемых готовых стандартов. Каждый образец анализировали в двух аналитических повторностях.

Статистический анализ. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ среднеквадратичное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни (критерий числа инверсий). Различия принимали значимыми при $p < 0,05$; количество экспериментальных животных — $n \geq 3$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Доказательства наличия симпатической иннервации нервно-мышечного соединения в мышцах разного функционального профиля. Добавление в экспериментальную камеру с физиологическим раствором, в которой находился

НМП, флуоресцентного красителя FM1-43 после кратковременной стимуляции двигательного нерва приводило к загрузке красителя в двигательное нервное окончание, т.к. краситель взаимодействовал с пресинаптической мембраной и в ходе стимуляции посредством эндоцитоза проникал в синаптические везикулы, окрашивая их (рис. 1, *a*).

Добавление в раствор флуоресцентного красителя FFN511, который является ложным нейромедиатором и взаимодействует с везикулярным переносчиком моноаминов, привело к окрашиванию синаптических везикул в симпатических нервах (рис. 1, средний столбец). Полученные в ходе наложения изображения (рис. 1, правый столбец) отчетливо показали наличие тесного контакта холинергических нервных окончаний двигательного нерва, визуализированных FM1-43, и симпатических нервов, где краситель FFN511 локализован не только в области синаптического контакта, но и по ходу двигательного нерва.

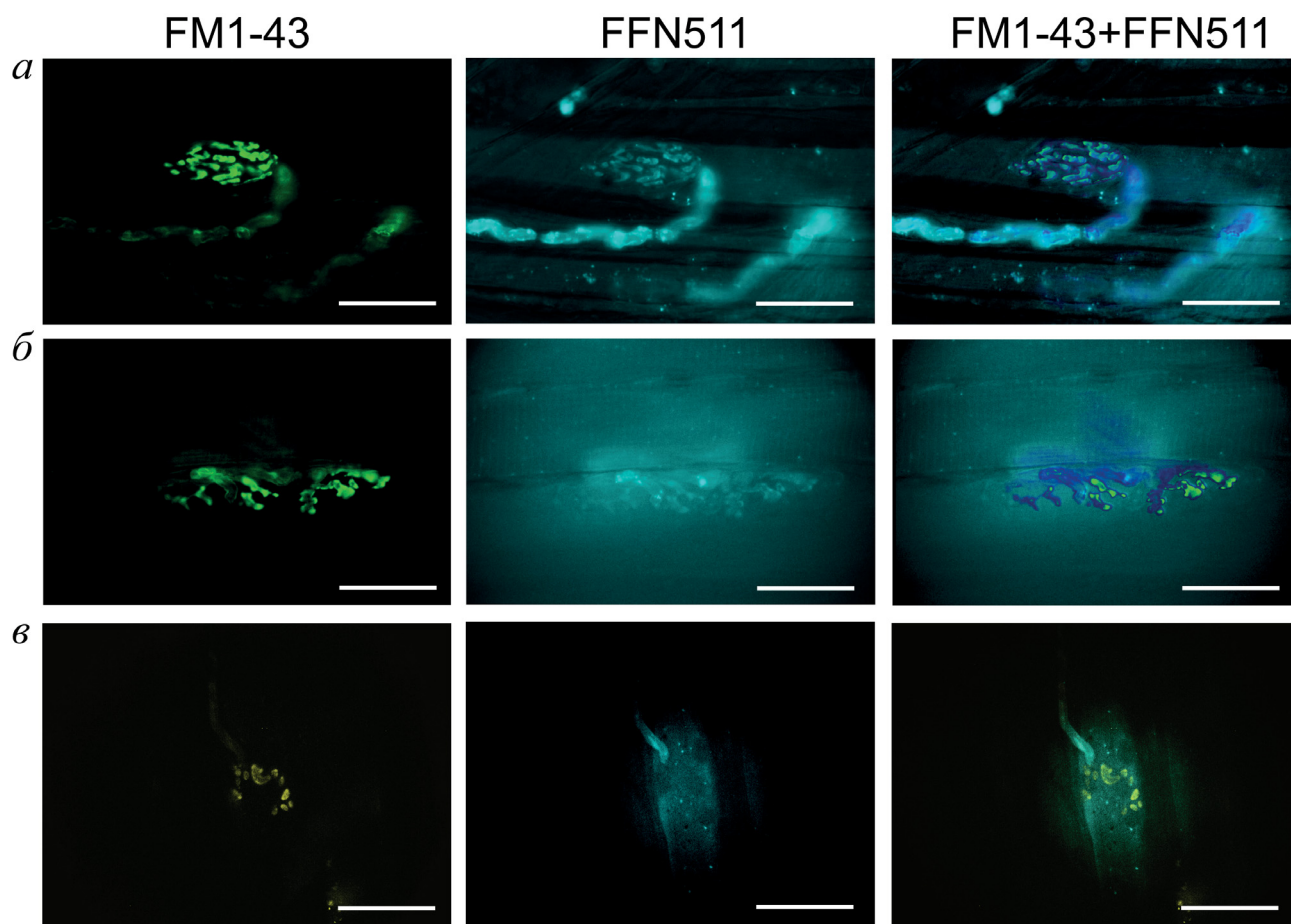


Рис. 1. Окрашивание НМП с помощью флуоресцентного красителя FM1-43, загружающегося в синаптические везикулы холинергического нервного окончания (левый столбец); флуоресцентного ложного нейромедиатора FFN511, визуализирующего симпатические варикозы (средний столбец); оценка расположения флуоресцентных сигналов относительно друг друга при совмещении каналов красителей (правый столбец) в НМП разных типов мышц: *a* — m. LAL, *б* — m. SOL, *в* — m. DIA. Масштаб — 20 мкм

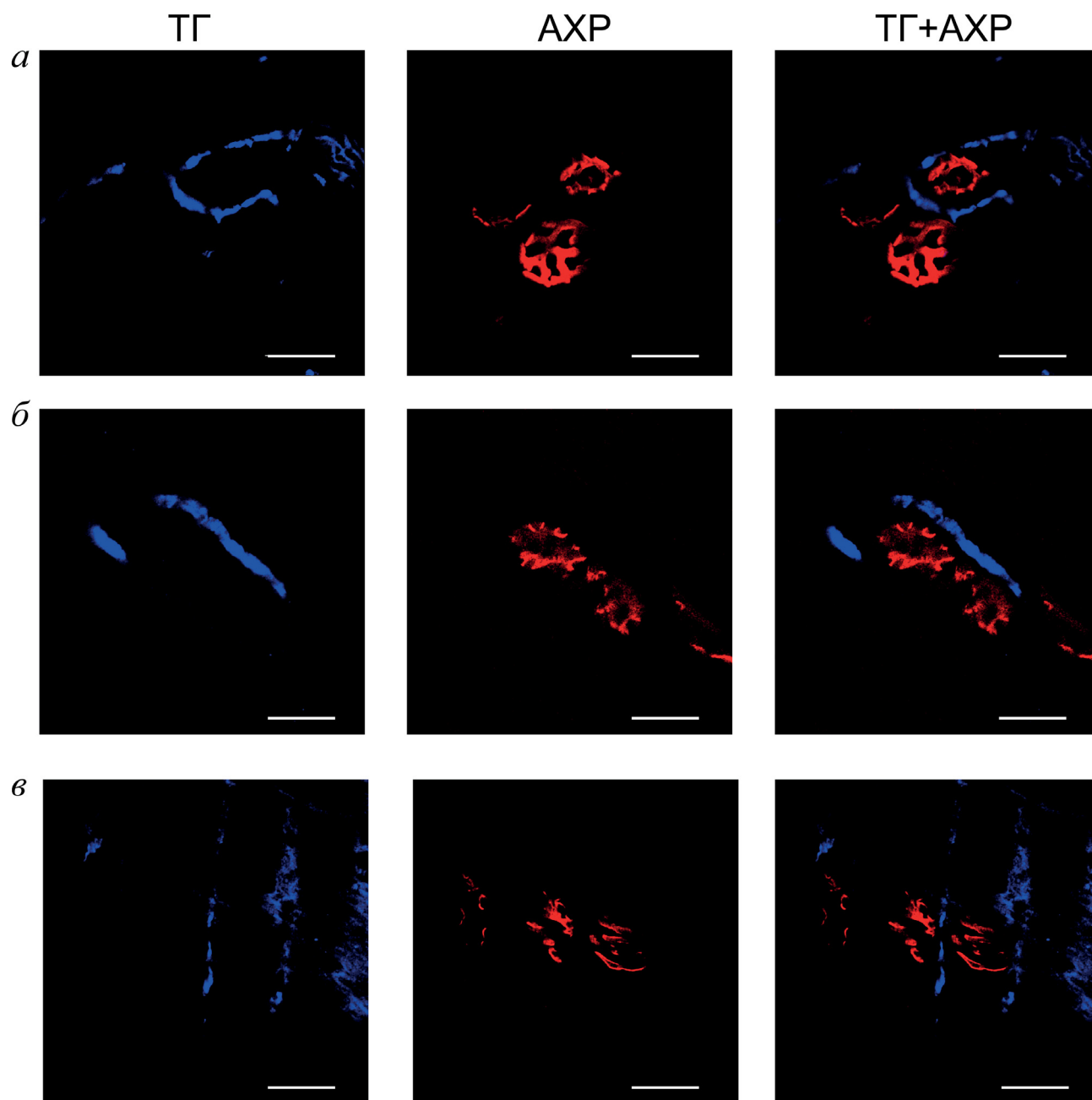


Рис. 2. Идентификация тирозингидроксилазы (ТГ) на гистологических срезах мышц мышей: *a* – *m. LAL*, *б* – *m. SOL*, *в* – *m. DIA*. Конфокальная микроскопия, масштаб – 20 мкм. Препараты окрашивали специфическими антителами к тирозингидроксилазе (ТГ, левый столбец), области синапсов визуализировали с помощью маркера ацетилхолиновых рецепторов (АХР, средний столбец), расположение флуоресцентных сигналов относительно друг друга оценивали при совмещении каналов красителей (правый столбец)

Локализация фермента синтеза катехоламинов, тирозингидроксилазы, вблизи нервно-мышечного синапса. Тирозингидроксилаза является ключевым ферментом биосинтеза катехоламинов [15, 32]. Поэтому до решения вопроса об определении эндогенных катехоламинов в области НМП был проведён иммуногистохимический анализ для определения данного фермента в области синаптического контакта. Использование специфических антител к тирозингидроксилазе и флуоресцентного α -бун-

гаротоксина, специфического агента для визуализации постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов в НМП, показало, что в непосредственной близости к нервно-мышечному синапсу в препаратах всех трёх типов мышц наблюдается окрашивание антителами к тирозингидроксилазе (рис. 2). Это наблюдение позволяет заключить, что в области синаптического контакта может содержаться эндогенный НА и/или АД, поскольку показано наличие фермента, участвующего в их синтезе.

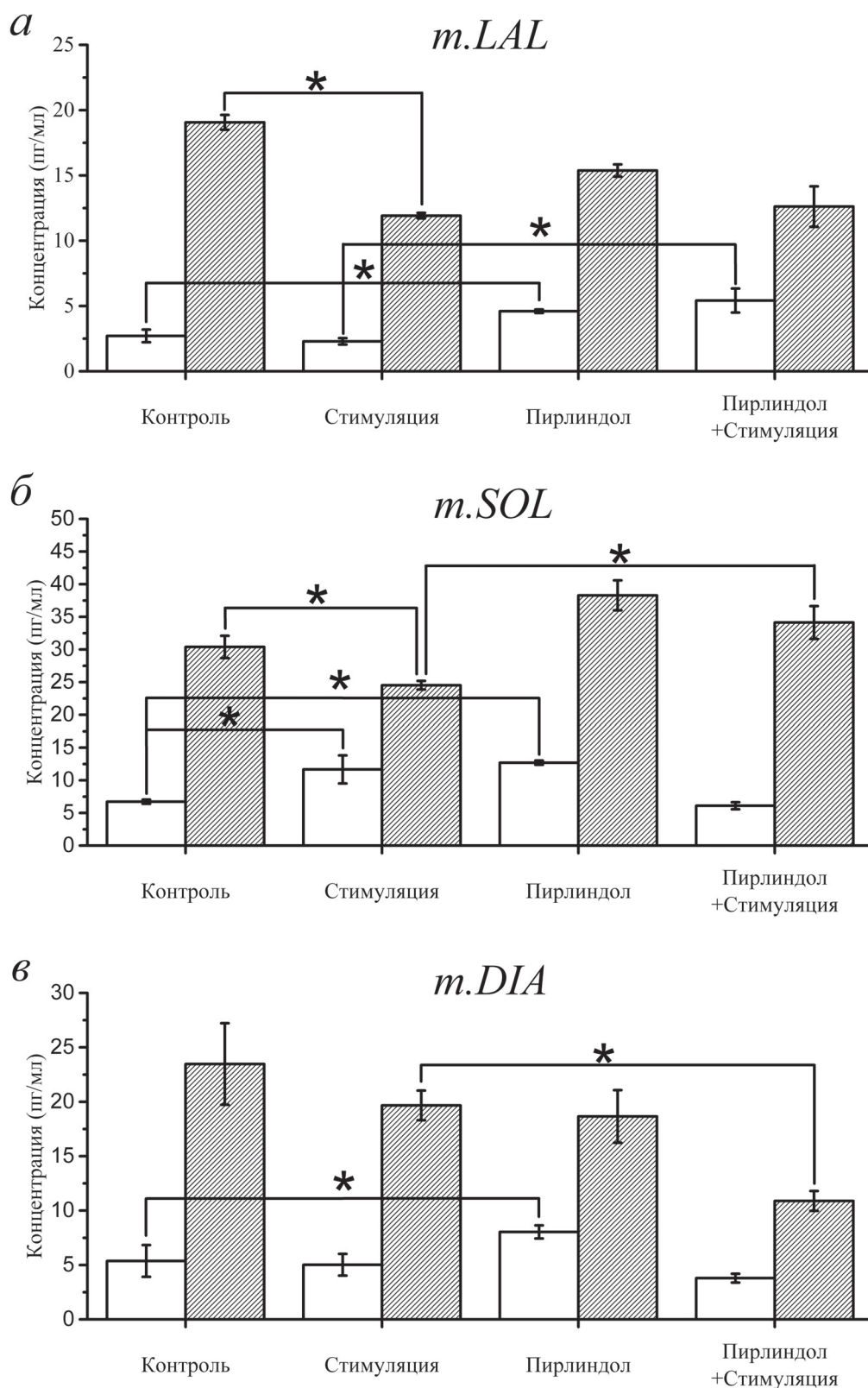


Рис. 3. Соотношение концентраций АД (белые столбцы) и НА (штрихованные столбцы) в образцах перфузионного раствора для трёх мышц и в разных условиях: *а* – *m. LAL*, контроль (30 мин); после стимуляции (10 мин) с частотой 70 Гц; после добавления пирлиндола; после стимуляции в присутствии пирлиндола; *б* – *m. SOL*, контроль (30 мин); после стимуляции (10 мин) с частотой 20 Гц; после добавления пирлиндола; после стимуляции в присутствии пирлиндола; *в* – *m. DIA*, контроль (30 мин); после стимуляции (10 мин) с частотой 50 Гц; после добавления пирлиндола; после стимуляции в присутствии пирлиндола. Представлены средние значения $\pm$ среднееквадратичное отклонение ($n = 6$). По оси ординат – концентрация катехоламинов в пг/мл. Во всех сериях концентрации НА достоверно выше, чем концентрации АД ($p < 0,05$). Различия считали статистически значимыми на уровне 0,05

Иммуноферментное определение концентрации АД и НА в растворе, омывающем НМП, при разных режимах его активности. Для определения концентраций эндогенных АД и НА в растворе, омывающем НМП, образцы перфузионного раствора в объеме 1 мл отбирали из экспериментальной камеры, в которой в состоянии покоя НМП находился в течение 30 мин. Другой НМП после 30 мин нахождения в контрольных условиях стимулировали, раздражая двигательный нерв в течение 10 мин с частотой, характерной для данного типа мышцы [30]. В третьем наборе образцов в раствор до стимуляции добавляли 50 мкМ пирлиндол — ингибитора моноаминоксидазы (МАО), которая обеспечивает деградацию катехоламинов [33]. После сбора образцов и проведения ИФА с учётом нормирования на массу НМП были определены концентрации АД и НА. Полученные данные представлены на рис. 3.

Оказалось, что в состоянии покоя для всех трёх типов мышц содержание НА в несколько раз (от 4 до 7) превышало концентрацию АД. Диапазон концентраций АД составил от $2,7 \pm 0,5$ пг/мл в m. LAL до $6,7 \pm 0,3$ пг/мл в m. SOL, тогда как концентрации НА составили от $19,1 \pm 0,6$ пг/мл (m. LAL) до $30 \pm 1,7$ пг/мл (m. SOL) (рис. 3, а, б). Наиболее высокие концентрации АД и НА были обнаружены в НМП мышцы «медленного» типа, наименьшие — в «быстрой», а для m. DIA «смешанного» типа наблюдались промежуточные значения.

При стимуляции двигательного нерва с частотой, характерной для каждого типа мышц, достоверное увеличение содержания АД на $74,6 \pm 10,7\%$ ($n = 6, p < 0,001$) наблюдалось для НМП «медленной» m. SOL, при этом уровень НА снижался на $45,9 \pm 12,6\%$ ($n = 6, p < 0,01$) (рис. 3, б). В НМП двух других мышц средние значения концентраций АД и НА достоверно не изменялись, поскольку были получены разнонаправленные изменения содержания эндогенных катехоламинов в разных образцах. После добавления пирлиндол — ингибитора МАО [33] — концентрация АД увеличилась в НМП всех трёх типов мышц, тогда как повышение НА наблюдалось только в «медленной» m. SOL (рис. 3, б). После стимуляции двигательного нерва и добавления пирлиндол достоверно увеличилась концентрация АД на $36,2 \pm 9,3\%$ ($n = 6, p < 0,05$) в «быстрой» m. LAL. В стимулированной «медленной» m. SOL на $39,2 \pm 10,0\%$ ($n = 6, p < 0,05$) выросло содержание НА в присутствии пирлиндол (для сравнения рис. 3, а и б), тогда как в образцах m. DIA концентрации АД и НА после стимуляции на фоне пирлиндол снижались. Полученные

данные свидетельствуют о наличии в растворе, омывающем НМП всех трёх типов мышц, эндогенных АД и НА, концентрация которых может меняться в зависимости от ритмической активности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существует два основных пула катехоламинов в периферической нервной системе, управляющей мышечными сокращениями. Это, во-первых, функциональный пул, представленный катехоламинами, которые освобождаются из мозгового вещества надпочечников, и НА из окончаний симпатических нервов [34]. Второй — тканевый пул, находящийся в компартментах синтеза и хранения в соме и аксонах симпатических нейронов. В настоящем исследовании мы впервые показали, что симпатические нервы, в которых везикулы в симпатических нервных окончаниях загружены ложным нейромедиатором FFN511, и нервно-мышечные синапсы, в которых двигательные нервные окончания загружены специфическим красителем FM1-43, находятся в непосредственной близости в НМП трёх исследованных скелетных мышц разного функционального профиля: «быстрой» мышцы поднимателя уха, m. LAL, «медленной» постуральной мышцы, m. SOL, и «смешанной» дыхательной мышцы диафрагмы, m. DIA. Фермент, участвующий в синтезе катехоламинов — тирозингидроксилаза — также был выявлен в области синаптического контакта в синапсах всех трёх типов мышц. Полученные нами данные о тесной колокализации тирозингидроксилазы с областью синаптического контакта в целом НМП согласуются с результатами работы Straka et al. 2018 г. [9], показавшими близкое расположение фермента синтеза катехоламинов и синапса на выделенных мышечных волокнах.

Наличие ферментов, участвующих в синтезе катехоламинов вблизи нервных окончаний, дало основания для попытки определить концентрации эндогенных АД и НА в растворе, омывающем НМП в условиях покоя и после стимуляции двигательного нерва с частотами, характерными для физиологического режима активности мышц данного профиля.

Результаты показали, что в НМП всех трёх типов мышц содержание НА многократно превышало концентрацию АД. Источниками эндогенных катехоламинов, как известно, являются мозговое вещество надпочечников для АД и окончания симпатических нервов для НА [35, 36]. Поэтому неудивительно, что результаты

показывают более чем 4-кратное превышение концентрации НА по сравнению с количеством АД, т.к. установлено наличие тесного контакта окончаний симпатических нервов, из которых высвобождается НА, в непосредственной близости к нервно-мышечным синапсам. Полученные с помощью метода ИФА значения концентраций АД и НА в диапазоне от 2 пг/мл до 30 пг/мл по порядку величин совпадают со значениями, определяемыми в плазме крови другими методами — радиоэнзиматическим методом, а также с помощью ВЭЖХ. Концентрация АД, полученная этими методами, составляла 5–19 пг/мл, концентрация НА — 10–34 пг/мл [37, 38]. Анализ содержания НА в образцах, взятых из трёхглавой мышцы голени крысы с помощью микродиализного зонда, вставленного между мышечными волокнами, показал концентрацию НА $2,12 \pm 0,06$ нМ, что соответствует 0,7 нг/мл [38]. Очевидно, что различия в наблюдаемых значениях концентраций могут быть обусловлены множеством разных факторов, таких как характеристики животных (возраст, пол, физическая активность) и экспериментальные условия, в которых проводились измерения.

Учитывая, что эффекты катехоламинов вследствие представительства разных подтипов АДР могут существенно различаться в мышцах, содержащих разные типы мышечных волокон [39], для анализа были выбраны НМП трёх разных скелетных мышц мыши, которые отличаются как составом мышечных волокон, так и функциями, которые они выполняют. Мышца-подниматель уха, m. LAL, состоящая преимущественно из «быстрых» мышечных волокон (тип II), служит для быстрых изменений положения уха грызуна, для которого тонкое восприятие слуховых сигналов является жизненно важным. «Медленная» камбаловидная мышца, m. SOL, с типом I мышечных волокон необходима для обеспечения позы. Диафрагмальная мышца, m. DIA, участвующая в процессе дыхания, содержит оба типа волокон и относится к мышцам «смешанного» типа. Согласно результатам проведённого анализа, наиболее высокие концентрации как АД, так и НА зафиксированы в НМП мышцы m. SOL. Как видно из рис. 1, б, в синапсе этой мышцы флуоресцентный краситель, загружаемый в везикулы окончания симпатического нерва, находится практически непосредственно вблизи холинергического нервного окончания. Стимуляция двигательного нерва с частотой, характерной для данного типа мышцы (20 Гц), привела к повышению содержания АД на 73%, увеличения концентрации НА

не наблюдалось. В НМП двух других мышц не было обнаружено достоверных изменений содержания АД и НА после стимуляции нерва, поскольку имели место разнонаправленные изменения концентраций АД и НА. Одним из возможных вариантов объяснения такого явления может быть предположение об усилении при стимуляции активности системы, которая участвует в деградации катехоламинов и обеспечении их низкой концентрации. Она представлена ферментами MAO, локализованной в митохондриях, и катехол-О-метилтрансферазой, находящейся в симпатических нейронах и синаптической щели [40, 41]. Для того чтобы проверить эту гипотезу, было проведено измерение концентраций АД и НА после добавления обратимого ингибитора MAO пирлиндолла. Ожидаемое увеличение концентрации АД в 2,3 раза наблюдалось в НМП «быстрой» m. LAL и концентрации НА на 39% в «медленной» m. SOL. Интересно, что концентрация НА во внеклеточной жидкости гиппокампа в состоянии покоя составляла приблизительно 14 нМ, при этом добавление блокатора обратного захвата дезипрамина так же, как и в НМП диафрагмы, не оказывало существенного влияния на содержание НА [42]. Эти наблюдения подчёркивают тот факт, что, по-видимому, может существовать несколько регуляторных механизмов, которые влияют на уровень катехоламинов во внеклеточной жидкости.

Эффекты блокаторов АДР на функции НМП.

Если эндогенные АД и НА находятся в непосредственной близости к синаптическому контакту, а активация АДР разных подтипов изменяет его функции, то блокирование этих рецепторов также должно приводить к изменению работы синапса. Действительно, ранее нами было показано, что блокирование $\alpha 2$ -АДР с помощью SKF 86466 и $\beta 2$ -АДР с помощью ICI 118,551 уменьшало спонтанное высвобождение ацетилхолина в НМП диафрагмы [17]. Действие антагониста $\alpha 2$ -АДР йохимбина приводило к снижению квантового состава ПКП и возрастанию несинхронности выделения квантов нейромедиатора. Блокада $\beta 1$ -АДР атенололом вызывала, напротив, синхронизацию секреторного процесса. Ранее Lim и Muir (1983) также показали, что в нервно-мышечных синапсах диафрагмы крыс йохимбин вызывал снижение квантовой секреции ацетилхолина [43]. В синапсах «быстрой» m. LAL блокада $\beta 2$ -АДР с помощью ICI 118,551 вызывала гиперполяризацию мембраны мышечного волокна [18]. Все эти данные указывают на присутствие эндогенных катехоламинов в синаптической щели и их участие

в модуляции работы НМП. Исследования, в которых иммунофлуоресценция, конфокальная микроскопия и вестерн-блоттинг продемонстрировали близость окончаний симпатических нейронов к нервно-мышечным синапсам в диафрагме, длинном разгибателе пальца, передней большеберцовой и камбаловидной мышцах, подтвердили наличие такого контакта [8, 9, 44]. Кроме того, последствия симпатэктомии вызывали значительное снижение силы непрямого мышечного сокращения [24] и уменьшение квантового высвобождения ацетилхолина [43], демонстрируя высокую вероятность влияния эндогенных катехоламинов на синаптическую передачу в НМП. В подтверждение важной функциональной роли эндогенных катехоламинов было показано, что прямая стимуляция симпатических нейронов усиливала нервно-мышечную передачу у молодых мышей посредством высвобождения катехоламинов из симпатических аксонов, которые действуют на β -АДР, экспрессирующиеся в мотонейронах [9, 44]. Эффекты симпатэктомии, оказываемые на нервно-мышечную передачу, включают дезорганизацию цитоскелета в аксонах двигательных нейронов, дефекты миелинизации, уменьшение диаметра аксона и уменьшение площади поперечного сечения мышц [24]. В целом можно сделать вывод, что элементы симпатической нервной системы находятся в непосредственном контакте с нервно-мышеч-

ными синапсами скелетной мускулатуры и участвуют в регуляции работы синаптического контакта, выделяя эндогенные катехоламины, которые влияют на высвобождение нейромедиатора ацетилхолина и, таким образом, могут изменять сократительную функцию скелетной мускулатуры.

Вклад авторов. Э.А. Бухараева — концепция и руководство работой, написание текста; С.А. Дмитриева, С.Г. Вологин — ИФА; А.Н. Ценцевичский, А.Ю. Архипов, В.Ф. Хузахметова — набор экспериментальных НМП; Г.В. Сибгатуллина — иммуногистохимический анализ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-0046). Иммуноферментный анализ, пробоподготовка и анализ данных выполнены Дмитриевой С.А. и Володиным С.Г. при поддержке госзадаaniem ФИЦ КазНЦ РАН.

Благодарности. Авторы благодарят д.б.н. Петрова А.М. за критическое рассмотрение рукописи и полезные рекомендации.

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corkill, A. B., and Tiegs, O. W. (1933) The effect of sympathetic nerve stimulation on the power of contraction of skeletal muscle, *J. Physiol.*, **78**, 161-185, doi: 10.1113/jphysiol.1933.sp002995.
2. Brown, G. L., Bühlbring, E., and Burns, B. D. (1948) The action of adrenaline on mammalian skeletal muscle, *J. Physiol.*, **107**, 115-128, doi: 10.1113/jphysiol.1948.sp004255.
3. Steiner, J. L., Johnson, B. R., Hickner, R. C., Ormsbee, M. J., Williamson, D. L., and Gordon, B. S. (2021) Adrenal stress hormone action in skeletal muscle during exercise training: An old dog with new tricks? *Acta Physiol. (Oxf)*, **231**, e13522, doi: 10.1111/apha.13522.
4. Kvetnansky, R., Lu, X., and Ziegler, M. G. (2013) Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems, *Adv. Pharmacol.*, **68**, 359-397, doi: 10.1016/B978-0-12-411512-5.00017-8.
5. Tank, A. W., and Lee Wong, D. (2015) Peripheral and central effects of circulating catecholamines, *Compr. Physiol.*, **5**, 1-15, doi: 10.1002/cphy.c140007.
6. Zouhal, H., Jacob, C., Delamarche, P., and Gratas-Delamarche, A. (2008) Catecholamines and the effects of exercise, training and gender, *Sports Med.*, **38**, 401-423, doi: 10.2165/00007256-200838050-00004.
7. Andersson, D. C., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Umanskaya, A., Shiomi, T., and Marks, A. R. (2012) Stress-induced increase in skeletal muscle force requires protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor, *J. Physiol.*, **590**, 6381-6387, doi: 10.1113/jphysiol.2012.237925.
8. Khan, M. M., Lustrino, D., Silveira, W. A., Wild, F., Straka, T., Issop, Y., O'Connor, E., Cox, D., Reischl, M., Marquardt, T., Labeit, D., Labeit, S., Benoit, E., Molgó, J., Lochmüller, H., Witzemann, V., Kettelhut, I. C., Navegantes, L. C., Pozzan, T., and Rudolf, R. (2016) Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 746-750, doi: 10.1073/pnas.1524272113.

9. Straka, T., Vita, V., Prokshi, K., Hörner, S. J., Khan, M. M., Pirazzini, M., Williams, M. P. I., Hafner, M., Zaglia, T., and Rudolf, R. (2018) Postnatal development and distribution of sympathetic innervation in mouse skeletal muscle, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1935, doi: 10.3390/ijms19071935.
10. Kim, J., Grotegut, C. A., Wisler, J. W., Li, T., Mao, L., Chen, M., Chen, W., Rosenberg, P. B., Rockman, H. A., and Lefkowitz, R. J. (2018) β -arrestin 1 regulates β 2-adrenergic receptor-mediated skeletal muscle hypertrophy and contractility, *Skelet. Muscle*, **8**, 39, doi: 10.1186/s13395-018-0184-8.
11. Williams, R. S., Caron, M. G., and Daniel, K. (1984) Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training, *Am. J. Physiol.*, **246**, 160-167, doi: 10.1152/ajpendo.1984.246.2.E160.
12. Hinkle, R. T., Hodge, K. M. B., Cody, D. B., Sheldon, R. J., Kobilka, B. K., and Isfort, R. J. (2002) Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor, *Muscle Nerve*, **25**, 729-734, doi: 10.1002/mus.10092.
13. Lynch, G. S., and Ryall, J. G. (2008) Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease, *Physiol. Rev.*, **88**, 729-767, doi: 10.1152/physrev.00028.2007.
14. Tsentsevitsky, A., Kovyazina, I., and Bukharaeva, E. (2019) Diverse effects of noradrenaline and adrenaline on the quantal secretion of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction, *Neuroscience*, **423**, 162-171, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.049.
15. Nagatsu, T., Levitt, M., and Udenfriend, S. (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2910-2917, doi: 10.1016/S0021-9258(18)93832-9.
16. Tsentsevitsky, A., Nurullin, L., Tyapkina, O., and Bukharaeva, E. (2020) Sympathomimetics regulate quantal acetylcholine release at neuromuscular junctions through various types of adrenoceptors, *Mol. Cell. Neurosci.*, **108**, 103550, doi: 10.1016/j.mcn.2020.103550.
17. Arkhipov, A., Khuzakhmetova, V., Petrov, A. M., and Bukharaeva, E. A. (2022) Catecholamine-dependent hyperpolarization of the junctional membrane via β 2-adrenoreceptor/Gi-protein/ α 2-Na-K-ATPase pathway, *Brain Res.*, **1795**, 148072, doi: 10.1016/j.brainres.2022.148072.
18. Khuzakhmetova, V., and Bukharaeva, E. (2020) Adrenaline facilitates synaptic transmission by synchronizing release of acetylcholine quanta from motor nerve endings, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **41**, 395-401, doi: 10.1007/s10571-020-00840-3.
19. Anderson, A. J., and Harvey, A. L. (1988) Effects of the facilitatory compounds catechol, guanidine, noradrenaline and phencyclidine on presynaptic currents of mouse motor nerve terminals, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **338**, 133-137, doi: 10.1007/bf00174860.
20. Bukharaeva, E. A., Kim, K. C., Moravec, J., Nikolsky, E. E., and Vyskočil, F. (1999) Noradrenaline synchronizes evoked quantal release at frog neuromuscular junctions, *J. Physiol.*, **517**, 879-888, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0879s.x.
21. Kuba, K. (1970) Effects of catecholamines on the neuromuscular junction in the rat diaphragm, *J. Physiol.*, **211**, 551-570, doi: 10.1113/jphysiol.1970.sp009293.
22. Kuba, K., and Tomita, T. (1971) Noradrenaline action on nerve terminal in the rat diaphragm, *J. Physiol.*, **217**, 19-31, doi: 10.1113/jphysiol.1971.sp009557.
23. Rodrigues, A. Z., Wang, Z. M., Messi, M. L., and Delbono, O. (2019) Sympathomimetics regulate neuromuscular junction transmission through TRPV1, P/Q- and N-type Ca^{2+} channels, *Mol. Cell. Neurosci.*, **95**, 59-70, doi: 10.1016/j.mcn.2019.01.007.
24. Gubernator, N. G., Zhang, H., Staal, R. G., Mosharov, E. V., Pereira, D. B., Yue, M., Balsanek, V., Vadola, P. A., Mukherjee, B., Edwards, R. H., Sulzer, D., and Sames, D. (2009) Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals, *Science*, **324**, 1441-1444, doi: 10.1126/science.1172278.
25. Betz, W. J., and Bewick, G. S. (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction, *Science*, **255**, 200-203, doi: 10.1126/science.1553547.
26. Reid, B., Slater, C. R., Bewick, G. S. (1999) Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals, *J. Neurosci.*, **19**, 2511-2521, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-07-02511.1999.
27. Petrov, A., Zakirjanova, G., Kovyazina, I., Tsentsevitsky, A., and Bukharaeva, E. (2022) Adrenergic receptors control frequency-dependent switching of the exocytosis mode between "full-collapse" and "kiss-and-run" in murine motor nerve terminal, *Life Sci.*, **296**, 120433, doi: 10.1016/j.lfs.2022.120433.
28. Murphy, J. F., Davies, D. H., and Smith, C. J. (1992) The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenalin and noradrenalin, *J. Immunol. Meth.*, **154**, 89-98, doi: 10.1016/0022-1759(92)90216-g.
29. Slater, C. R. (2015) The functional organization of motor nerve terminals, *Prog Neurobiol.*, **134**, 55-103, doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.004.
30. Westermann, J., Hubl, W., Kaiser, N., and Salewski, L. (2002) Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method, *Clin Lab.*, **48**, 61-71.
31. Tekin, I., Roskoski, R. Jr., Carkaci-Salli, N., and Vrana, K. E. (2014) Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase, *J. Neural. Transm.*, **121**, 1451-1481, doi: 10.1007/s00702-014-1238-7.

32. Bruhwyler, J., Liégeois, J. F., and Géczy, J. (1997) Pirlindole: a selective reversible inhibitor of monoamine oxidase A. A review of its preclinical properties, *Pharmacol. Res.*, **36**, 23-33, doi: 10.1006/phrs.1997.0196.
33. Peyrin, L., and Dalmaz, Y. (1975) Peripheral secretion and inactivation of catecholamines (adrenaline, noradrenaline, dopamine) [In French], *J. Physiol.*, **70**, 353-433.
34. Eisenhofer, G., Kopin, I., and Goldstein, D. (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine, *Pharmacol. Rev.*, **56**, 331-349, doi: 10.1124/pr.56.3.1.
35. Hjendahl, P., Daleskog, M., and Kahan, T. (1979) Determination of plasma catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison with a radioenzymatic method, *Life Sci.*, **25**, 131-138, doi: 10.1016/0024-3205(79)90384-9.
36. Liao, Y. T., Wang, S. M., Wang, J. R., Yu, C. K., and Liu, C. C. (2015) Norepinephrine and epinephrine enhanced the infectivity of enterovirus, *PLoS One*, **10**, e0135154, doi: 10.1371/journal.pone.0135154.
37. Li, J., King, N. C., and Sinoway, L. I. (2005) Interstitial ATP and norepinephrine concentrations in active muscle, *Circulation*, **111**, 2748-2751, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510669.
38. Martin, W. H., Murphree, S. S., and Saffitz, J. E. (1989) Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle, *Circ. Res.*, **64**, 1096-1105, doi: 10.1161/01.res.64.6.1096.
39. Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Rozycka, A., Lianeri, M., and Kozubski, W. (2013) Polymorphism of the COMT, MAO, DAT, NET and 5-HTT genes, and biogenic amines in Parkinson's disease, *Curr. Genomics*, **14**, 518-533, doi: 10.2174/1389202914666131210210241.
40. Goldstein, D. S. (2020) The "sick-but-not-dead" phenomenon applied to catecholamine deficiency in neurodegenerative diseases, *Semin. Neurol.*, **40**, 502-514, doi: 10.1055/s-0040-1713874.
41. Abercrombie, E. D., Keller, R. W. Jr, and Zigmond, M. J. (1988) Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies, *Neuroscience*, **27**, 897-904, doi: 10.1016/0306-4522(88)90192-3.
42. Lim, S. P., and Muir, T. C. (1983) Microelectrode recording of the effects of agonists and antagonists on alpha-adrenoceptors on rat somatic nerve terminals, *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 41-46, doi: 10.1111/j.1476-5381.1983.tb11047.x.
43. Wang, Z. M., Rodrigues, A. C. Z., Messi, M. L., and Delbono, O. (2020) Aging blunts sympathetic neuron regulation of motoneurons synaptic vesicle release mediated by β_1 - and α_2B -adrenergic receptors in geriatric mice, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **75**, 1473-1480, doi: 10.1093/gerona/glaa022.
44. Rodrigues, A. C. Z., Messi, M. L., Wang, Z. M., Abba, M. C., Pereyra, A., Birbrair, A., Zhang, T., O'Meara, M., Kwan, P., and Lopez, E. I. S. (2019) The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability, *Acta Physiol.*, **225**, 13195, doi: 10.1111/apha.13195.

SYMPATHETIC INNERVATION AND ENDOGENOUS CATECHOLAMINES IN NEUROMUSCULAR PREPARATIONS OF MUSCLES OF DIFFERENT FUNCTIONAL PROFILES

S. A. Dmitrieva¹, S. G. Vologin², A. N. Tsentsevitsky¹, A. Y. Arkhipov¹,
V. F. Khuzakhmetova¹, G. V. Sibgatullina¹, and E. A. Bukharaeva^{1*}

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC "Kazan Scientific Center of RAS",
420111 Kazan, Russia; e-mail: elbukhara@gmail.com

² Tatar Research Institute of Agriculture, FRC "Kazan Scientific Center of RAS",
420059 Kazan, Russia

Influence of the sympathetic nervous system on the work of skeletal muscles contractile apparatus is now beyond doubt. However, until recently there was no evidence that the endings of sympathetic nerves can be located in close proximity to the neuromuscular synapses, and there is also no reliable data on how much endogenous adrenaline and noradrenaline can be contained near the synaptic contact in skeletal muscles. In this research, using fluorescent analysis, immunohistochemical and enzyme immunoassays the isolated neuromuscular preparations of three skeletal muscles of different functional profiles and containing different types of muscle fibers were examined. Close contact between the sympathetic and motor cholinergic nerve endings and the presence of tyrosine hydroxylase in this area were demonstrated. Concentrations of endogenous adrenaline and noradrenaline in the solution perfusing the neuromuscular preparation were

determined under different modes of its functioning. The effects of α and β adrenoceptor blockers on the processes of acetylcholine quantal secretion from the motor nerve endings were compared. The data obtained provide evidence for the presence of endogenous catecholamines in the neuromuscular junction region and their role in the modulation of the synaptic function.

Keywords: neuromuscular junction, sympathetic innervation, tyrosine hydroxylase, endogenous catecholamines, adrenoceptor blockers

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА-1 ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Обзор

© 2023 И.И. Зорина*, Н.Ф. Аврова, И.О. Захарова, А.О. Шпаков

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: zorina.inna.spb@gmail.com

Поступила в редакцию 11.10.2022

После доработки 07.11.2022

Принята к публикации 07.11.2022

В настоящее время подходы, применяемые для лечения инсульта, имеют существенные ограничения, а нейропротекторная терапия малоэффективна. В связи с этим поиск эффективных нейропротекторов и разработка новых нейропротективных стратегий при церебральной ишемии по-прежнему актуальны. Инсулин и инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) играют важную роль в функционировании мозга, вовлечены в регуляцию роста, дифференцировки и выживаемости нейронов, нейрональной пластичности, пищевого поведения, контролируют периферический метаболизм и эндокринные функции. Они оказывают комплексное воздействие на мозг, в том числе демонстрируют нейропротекторное действие при церебральной ишемии и инсульте. В экспериментах на животных и клеточных культурах показано, что инсулин и IGF-1 в условиях гипоксии улучшают энергетический обмен в нейронах и глиальных клетках, оказывают положительное влияние на микроциркуляцию крови в мозге, восстанавливают функции нервных клеток и процессы нейротрансмиссии, оказывают противовоспалительное и антиапоптотическое действие на клетки мозга. Наибольший интерес для клиники представляет интраназальный путь введения инсулина и IGF-1, поскольку он позволяет дозированно доставлять их непосредственно в мозг, минуя гематоэнцефалический барьер. Интраназально вводимый инсулин демонстрирует выраженный положительный эффект при коррекции когнитивных нарушений у пожилых людей с нейродегенеративными и метаболическими расстройствами. Инсулин и IGF-1, вводимые интраназально, повышают выживаемость животных с ишемическим инсультом. В обзоре обсуждаются данные литературы и результаты собственных исследований о механизмах нейропротекторного действия интраназально вводимых инсулина и IGF-1 при церебральной ишемии и перспективы их применения для нормализации функций ЦНС и снижения нейродегенеративных изменений при этой патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: интраназальный инсулин, инсулиноподобный фактор роста-1, ишемия головного мозга, реперфузия, нейропротекторный эффект, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523030077, **EDN:** QWRRGY

ВВЕДЕНИЕ

После открытия инсулина Бантингом и Бестом в 1921 г. было установлено, что этот гормон, продуцируемый панкреатическими β -клетками, при введении в организм оказывает выраженный гипогликемический эффект,

играя ключевую роль в контроле глюкозного гомеостаза. Длительное время общепринятой была точка зрения, что функции инсулина ограничиваются в основном контролем метаболизма углеводов и жиров, и мозг при этом не рассматривался как его возможная мишень. Обнаружение инсулина и его сигнальной

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ИВИ – интраназально вводимый инсулин; ПОЛ – перекисное окисление липидов; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; GSK3 β – киназа-3 β гликогенсинтазы; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1; IGF1R – рецептор IGF-1; INSR – инсулиновый рецептор; IRS-белки – белки-субстраты рецептора инсулина; MAPK – митогенактивируемые протеинкиназы; МСАО – модель окклюзии средней мозговой артерии; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; tPA – активатор тканевого плазминогена.

* Адресат для корреспонденции.

системы в структурах мозга, а также исследования регуляторных эффектов инсулина на функции ЦНС кардинально изменили эту точку зрения и показали, что инсулин важен как для функционирования мозга, так и периферических тканей [1]. Было показано, что центральные механизмы действия присущи структурному гомологу инсулина – инсулиноподобному фактору роста-1 (IGF-1), который, как и инсулин, относится к семейству инсулиновых пептидов и имеет сходный с ним сигнальный каскад.

ИНСУЛИН И ЕГО СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ В МОЗГЕ

Инсулин в мозге впервые был обнаружен Navrankova et al. [2], после чего встал вопрос о его источнике в ЦНС. Были получены доказательства, что циркулирующий в кровотоке панкреатический инсулин впоследствии через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) поступает в мозг. Его транспорт может реализовываться как с участием инсулиновых рецепторов (INSR) с помощью рецептор-опосредуемого эндоцитоза [3], так и без образования инсулин-рецепторного комплекса – путем пассивного проникновения через фенестрированные капилляры и эпендимные клетки срединного возвышения гипоталамуса или посредством транспорта из спинномозговой жидкости с участием таницитов [4]. Однако расшифровка транспортных путей поступления инсулина в мозг не позволяет объяснить его высокий уровень в мозге в неонатальный период развития, когда инсулин-продуцирующая функция поджелудочной железы отсутствует или еще недостаточна для синтеза значимых количеств гормона. Это оставляет открытым вопрос о возможности синтеза инсулина в ЦНС, по крайней мере на ранних стадиях онтогенеза. В пользу этого свидетельствует обнаружение мРНК для проинсулина в гипоталамусе, CA1- и CA3-областях гиппокампа, зубчатой извилине, обонятельной луковице у эмбрионов крыс, новорожденных крысят и кроликов [5, 6], а также в первичной культуре нейронов, полученных из различных областей эмбрионального мозга кроликов [7]. Необходимо отметить, что как нейроны, так и панкреатические β -клетки являются электрически возбудимыми и отвечают деполяризацией и экзоцитозом на гормональные стимулы и повышение уровня глюкозы. Это важно для синтеза и секреции инсулина, поскольку оба этих процесса требуют деполяризации

АТР-чувствительных калиевых каналов, функционально активных в нейронах и β -клетках [8].

В нейронах и глиальных клетках головного мозга присутствуют все компоненты инсулиновой системы, включая INSR [9]. В ходе альтернативного сплайсинга гена *Insr* генерируются две изоформы рецептора – укороченная (INSR-A) и полноразмерная (INSR-B), которые, несмотря на сходство структурно-функциональной организации, имеют ряд различий [10]. Несмотря на то что в большинстве тканей экспрессируются обе изоформы INSR, соотношение INSR-A/INSR-B в мозге значительно выше, чем на периферии, вследствие чего INSR-A часто называют нейрональной изоформой INSR. INSR-A и INSR-B представляют собой $\alpha_2\beta_2$ -гетеротетрамеры, в которых внеклеточные α -субъединицы и трансмембранные β -субъединицы соединены между собой дисульфидными связями [11, 12]. α -Субъединица и *N*-концевая часть β -субъединицы образуют внеклеточную часть INSR и ответственны за высокоаффинное связывание инсулина. В цитоплазматической части β -субъединицы локализован высококонсервативный тирозинкиназный домен, активность которого стимулируется в результате связывания гормона с α -субъединицей рецептора [11].

После взаимодействия инсулина с α -субъединицей INSR ее конформация меняется, что вызывает изменение конформации β -субъединицы и активирует тирозинкиназный домен, вызывая аутофосфорилирование INSR по трем остаткам тирозина (Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶², Tyr¹¹⁶³). После аутофосфорилирования β -субъединица становится мишенью для белков-субстратов рецептора инсулина (IRS-белков) и ряда других регуляторных и адаптерных молекул, имеющих в своей структуре фосфотирозинсвязывающие участки. Взаимодействие с ними активирует сразу несколько сигнальных путей [13]. Нокаут гена *Insr* в гиппокампе и амигдале мышей как отдельно, так и вместе с нокаутом гена, который кодирует родственный ему рецептор IGF-1 (IGF1R), приводит к когнитивным и поведенческим нарушениям, что указывает на участие инсулина в контроле функций ЦНС [1].

Среди известных в настоящее время 6 изоформ IRS-белков ведущую роль в инсулиновом пути играют IRS-1 и IRS-2, которые обнаруживаются почти во всех типах клеток и тканей. В их *N*-концевой части располагаются плекстрингомолгический и фосфотирозинсвязывающий домены, необходимые для ассоциации IRS-белков с мембраной и с молекулой INSR. В *C*-концевой части IRS-1 и IRS-2

располагается домен, отвечающий за взаимодействие с белками, содержащими SH2-домены, которые являются основными эффекторами инсулиновой сигнальной системы [14]. К белкам, содержащим SH2-домены, относятся: (1) фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), ключевой компонент 3-фосфоинозитидного пути; (2) адаптерный GRB2-белок, который опосредует активацию митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK); (3) протеинфосфотирозинфосфатаза SHP2; (4) нерецепторная тирозинкиназа Fyn; (5) супрессоры цитокинового сигналинга [13]. Между IRS-1 и IRS-2 имеются существенные различия — IRS-1 опосредует функции инсулина в основном на периферии, в то время как IRS-2 в большей степени вовлечен в реализацию эффектов инсулина в ЦНС [15].

Основным механизмом негативной регуляции инсулинового сигналинга является изменение статуса фосфорилирования рецептора и IRS-белков. Индуцированное с-Jun N-концевой киназой-1 (JNK1) фосфорилирование IRS-1 и IRS-2 по остаткам Ser и Thr приводит к их инактивации, что может служить одной из причин периферической и центральной инсулиновой резистентности [16]. В свою очередь, тирозинное дефосфорилирование активированных гормоном INSR и IRS-белков с помощью тирозинных фосфатаз — протеинфосфотирозинфосфатазы 1B (PTP1B) и T-клеточной фосфатазы — вызывает их инактивацию и подавляет трансдукцию инсулинового сигнала [17, 18].

IRS-белки связываются с фосфотирозин-связывающим доменом регуляторной субъединицы PI3K, которая катализирует синтез вторичного посредника — фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PI-3,4,5-P₃) [19]. Его образование индуцирует транслокацию 3-фосфатидилинозитол-зависимых протеинкиназ 1-го и 2-го типов (PDK1/2), белка SIN1, компонента комплекса mTORC2, и протеинкиназы АКТ (протеинкиназа B) к плазматической мембране [13]. Активация АКТ является одним из ключевых событий в трансдукции инсулинового сигнала. Этот фермент представлен тремя изоформами: АКТ1, АКТ2 и АКТ3, экспрессия которых в ЦНС зависит от области мозга и специфична для определенного типа нейронов и глиальных клеток. АКТ1 и АКТ3 в основном представлены в нейронах, в том числе миндалины, гиппокампа и коры больших полушарий, в то время как АКТ2 — в астроцитах [20].

После связывания с мембраной протеинкиназа PDK1 фосфорилирует АКТ по остатку Thr³⁰⁸ (для АКТ1). mTORC2 и ДНК-

зависимая протеинкиназа (DNA-PK) фосфорилируют АКТ по остатку Ser⁴⁷³, локализованному в С-концевом домене АКТ [21]. Таким образом, фосфорилирование АКТ сразу по двум сайтам ведет к полной ее активации, в результате чего АКТ фосфорилирует значительное число эффекторных нижележащих белков — опосредует активацию фосфодиэстеразы 3b, фосфоенолпируваткарбоксикиназы 1 и эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и ингибирование PGC1 α , p21^{kip}, киназы-3 β гликогенсинтазы (GSK3 β) и проапоптотического белка BAD. Вызванное АКТ фосфорилирование транскрипционных факторов FOXO1 и FOXK1 инактивирует их и выключает из процесса транскрипции генов [13]. АКТ играет важную роль в контроле жизнедеятельности клеток, участвуя в регуляции экспрессии генов, ответственных за протекание ростовых и метаболических процессов, клеточную выживаемость, ангиогенез и дифференцировку клеток. Одним из ключевых инсулин-опосредуемых эффектов АКТ является транслокация в плазматическую мембрану транспортера глюкозы GLUT4, что обеспечивает ее захват клетками [22].

Сигнальный путь, опосредуемый через АКТ, вовлечен в регуляцию метаболизма гликогена. Активированная форма АКТ фосфорилирует киназу GSK3 по Ser²¹ в случае изоформы GSK3 α или по Ser⁹ — в случае GSK3 β , что ведет к ее инактивации. Таким образом, АКТ блокирует GSK3-опосредуемую регуляцию активности гликогенсинтазы — ключевого фермента синтеза гликогена [23]. В последние годы, помимо синтеза гликогена, изучаются и иные функции GSK3, среди которых патогенез сахарного диабета, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. АКТ-индуцированное ингибирование GSK3 подавляет ее влияние на активность множества транскрипционных факторов и их регуляторов, включая NF- κ B, Snail, Notch, BAD, транскрипционные факторы FOX-семейства, что обуславливает ключевую роль каскада IRS/PI3K/АКТ/GSK3 в реализации эффектов инсулина на генную экспрессию, апоптоз, аутофагию, клеточную дифференцировку [23–25].

Другой важной мишенью инсулина является каскад MAPK. На начальном этапе комплекс GRB2–SOS взаимодействует с IRS-белками или с адаптерным белком SHC-1. Комплекс GRB2–SOS опосредует GDP/GTP-обмен малого G-белка p21ras, вызывая активацию каскада MAPK: Ras-белок→Raf-киназа→MEK-киназа→ERK1/2-киназа. ERK1/2 стимулирует активность различных транскрип-

ционных факторов и белков, в том числе рибосомального белка S6, NF-κB, протеин-фосфатазы-1 PP1, фактора MYT1, белка Elk-1, cAMP-регулируемого транскрипционного фактора CREB, протоонкогенов c-Fos и c-Jun, транскрипционных факторов STAT-семейства [13, 26]. Способность инсулина активировать MAPK-каскад обеспечивает кросс-взаимодействие инсулиновой системы с другими сигнальными путями, включающими компоненты каскада MAPK.

Инсулин стимулирует синтез белка посредством регуляции ключевых факторов инициации и элонгации трансляции через активацию как MAPK, так и mTORC1-комплекса. Активированная АКТ фосфорилирует адаптерный белок TSC1/2, негативный регулятор mTORC1, отменяя блокирующее влияние TSC1/2 на киназную активность комплекса и вызывая его активацию. mTORC1, в свою очередь, ингибирует факторы, индуцирующие аутофагию, и стимулирует рибосомальную p70-S6-киназу и транскрипционный фактор инициации трансляции eIF4E, что вносит значимый вклад в регуляцию биогенеза рибосом, процессы трансляции, трансляции и деградации белков. Активация mTORC1 также усиливает синтез липидов посредством активации фактора SREBP1 [13, 27, 28].

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЙ ФАКТОР РОСТА-1 И ЕГО СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ В МОЗГЕ

IGF-1 — полипептид, состоящий из 70 а.о., который вырабатывается в основном гепатоцитами и затем секретируется в кровоток. Циркулирующий в крови IGF-1 проникает через ГЭБ в мозг, где он регулирует рост и развитие нейронов и глиальных клеток [29]. В кровяном русле и в мозге IGF-1 расщепляется, что генерирует укороченную форму IGF-1 и N-концевой трипептид Gly-Pro-Glu, наделенные биологической активностью [30–32]. Некоторые ткани, включая мозг, способны локально экспрессировать и секретировать IGF-1, вследствие чего IGF-1 можно рассматривать как паракринный и аутокринный регулятор [32], причем в мозге он синтезируется как нейронами, так и глиальными клетками [33].

В мозге идентифицирован рецептор IGF-1 (IGF1R), который специфично связывает IGF-1 и структурно и функционально близок INSR [34]. Сходство INSR с IGF1R объясняется тем, что кодирующие их гены (*Insr* и *Igf1r*) произошли от общего анцестрального гена, а сами

рецепторы являются частью эволюционно древней высококонсервативной сигнальной системы у позвоночных, которая вовлечена в контроль метаболизма, роста и дифференцировки клеток [35]. IGF1R и различные изоформы INSR способны образовывать гомодимерные, гетеродимерные и гетероолигомерные комплексы, которые могут активироваться и инсулином, и IGF-1, хотя и с различной эффективностью. Большинство пострецепторных компонентов в сигнальных путях инсулина и IGF-1 в мозге являются сходными, что указывает на согласованные влияния этих гормонов на функции нейронов и глиальных клеток и свидетельствует об их способности по крайней мере частично заменять друг друга в процессе сигнальной трансдукции [36]. Среди общих блоков для инсулина и IGF-1 следует выделить все основные компоненты 3-фосфоинозитидного пути (IRS1/2, PI3K, АКТ-киназы) и компоненты каскада MAPK. Влияние IGF-1 на пролиферацию клеток опосредовано Raf/MEK/ERK-сигнальным путем, в то время как в регуляцию дифференциации клеток вовлечены пути, направленные на активацию АКТ [37]. Для развития и надлежащего функционирования ЦНС необходимо взаимодействие IGF-1-регулируемых каскадов с сигнальными путями, регулируемые другими ростовыми факторами — фактором роста фибробластов (FGF), эпидермальным фактором роста (EGF), фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и нейротрофическими факторами, в том числе BDNF [32]. Показано, что сигнальные пути IGF-1 вовлечены в нейрогенез и аксоногенез во взрослом мозге [38].

IGF-1, как и инсулин, способен оказывать нейромодуляторное, нейротрофическое, нейропротекторное действие на нейроны головного мозга, и, как следствие, нарушения в IGF-1-сигнальной системе мозга являются одним из патогенетических механизмов развития нейродегенеративных заболеваний и других расстройств ЦНС [39]. IGF-1 оказывает множественное действие, и его экспрессия наблюдается на протяжении всего онтогенеза — от раннего постнатального периода до зрелого возраста. IGF-1 играет важную роль в обеспечении нормального протекания эмбрионального периода развития мозга, в контроле миелинизации, образования синапсов, развитии нервной системы в постнатальный период и в регуляции нейрогенеза и нейротрансмиссии [32, 40]. Подобно другим ростовым факторам, IGF-1 оказывает мощный антиапоптотический эффект и выполняет функции нейропротектора при нейровоспалении, повышая выживаемость нейронов.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ В МОЗГЕ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ И ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ

Ишемия тканей, в том числе головного мозга, при различных по этиологии и патогенезу заболеваниях и состояниях (хирургические вмешательства, черепно-мозговая травма, асфиксия, геморрагия, эмболия, инфаркт миокарда, острые кровопотери, гипотензия и др.) является комплексным патологическим процессом. Тяжесть повреждения мозга и дальнейшая гибель нейронов обусловлены рядом факторов: выраженностью нарушений кровоснабжения ткани мозга, его длительностью, площадью пораженной зоны, метаболическим состоянием мозга и организма в целом перед развитием эпизода ишемии.

При фокальной ишемии головного мозга, т.е. при наличии локальной окклюзии сосудов, выраженность снижения скорости мозгового кровотока в различных структурах мозга сильно различается. В центре очага, в «коровой» области, наблюдается полное его прекращение, в то время как по направлению к периферии скорость кровотока в значительной степени восстанавливается, достигая его значений в норме [41]. Прекращение или резкое снижение кровоснабжения в «коровой» зоне сопровождается выраженным энергетическим дефицитом. В клетках нарушаются функции транспортных АТФаз, что приводит к дестабилизации ионного градиента, к потере внутриклеточного пула K^+ и к значительному увеличению $[Ca^{2+}]_i$ [42, 43]. Следствием этого

является деполяризация клеточных мембран с необратимым повреждением клеток и развитием некроза тканей. В тканях, окружающих «коровую» область, в так называемой зоне ишемической тени или пенумбры, патологические процессы менее выражены. Клетки здесь находятся в неактивном состоянии, поскольку им не хватает энергетических субстратов для адекватного функционирования. При раннем возобновлении кровотока нейроны в области пенумбры способны к восстановлению своих функций в отличие от клеток, локализованных в «коровой» области [44].

Нарушение мозгового кровотока приводит к запуску цепи событий на молекулярном и клеточном уровнях, результатом чего является истощение запасов энергии и следующая за этим гибель клеток. Снижение кровоснабжения тканей сопровождается нарушением функций митохондрий, образованием активных форм кислорода и азота, развитием окислительного повреждения биомолекул, эксайтотоксичностью, ингибированием синтеза белка, развитием стресса эндоплазматического ретикулума и активацией процессов воспаления [44, 45]. На рис. 1 в общем виде отражены основные процессы, происходящие при снижении кровотока и реперфузии тканей.

Деполяризация клеток в ходе церебральной ишемии приводит к высвобождению глутамата, что, в свою очередь, вызывает активацию ионных каналов и приводит к нарушению ионного баланса как в митохондриях, так и в цитозоле. Избыточный вход ионов кальция в клетку и их выход из внутренних депо приводит



Рис. 1. Основные патологические каскады при ишемии и реперфузии головного мозга. AMPA-рецептор — рецептор глутамата, селективно связывающий α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту; ГЭБ — гемато-энцефалический барьер; HIF1α — фактор, индуцируемый гипоксией 1-α; NMDA-рецептор — рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

к активации большого числа протеаз, липаз, эндонуклеаз, сигнальных протеинкиназ и фосфатаз, а также к стимуляции продукции активных форм кислорода, что является триггером каскадов, вызывающих гибель клетки [46]. В то же время стимуляция глутаматом синаптических NMDA-рецепторов вызывает активацию PI3K/АКТ-сигнального пути, который способствует выживаемости клеток мозга, оказывая тем самым нейропротекторное действие, что продемонстрировано в экспериментах с клеточными культурами и на животных моделях [47–49]. После активации АКТ-киназы она осуществляет фосфорилирование ниже лежащих мишеней, в том числе киназы-3 β гликогенсинтазы, проапоптотических белков BAD, BAX и p53, что приводит к ингибированию их проапоптотической активности и тем самым способствует выживаемости клеток [50]. Несмотря на запуск антиапоптотических каскадов, как компенсаторных механизмов, препятствующих нейродегенерации, длительное воздействие ишемии на структуры мозга приводит к дезинтеграции и необратимым изменениям в сигнальных каскадах, отвечающих за выживаемость и функциональную активность нейронов и глиальных клеток, результатом чего является их гибель путем апоптоза, некроза или аутофагии [50]. Более подробно с молекулярными механизмами повреждения клеток мозга при недостатке церебрального кровоснабжения можно ознакомиться в обзорных статьях [50, 51].

Важную роль в противодействии ишемии и гипоксии головного мозга играет транскрипционный фактор HIF-1 (фактор-1, индуцируемый гипоксией), состоящий из двух субъединиц: O₂-чувствительной HIF-1 α и конститутивно-экспрессируемой HIF-1 β . В условиях пониженного содержания кислорода происходит стабилизация HIF-1 α с дальнейшей активацией экспрессии HIF-1-зависимых генов. Установлено, что HIF-1 α усиливает экспрессию генов, которые кодируют белки, помогающие клеткам и тканям мозга адаптироваться к условиям гипоксии, такие как VEGF и эритропоэтин [52]. Наряду с этим, наблюдается повышение экспрессии и активация белков, обеспечивающих пролиферацию и выживаемость клеток, усиливается синтез гликолитических ферментов и других регуляторов метаболизма, а также интенсифицируется обмен железа [53]. Установлено, что уровень HIF-1 α в клетках повышается под действием целого ряда гормонов и ростовых факторов, в том числе инсулина, IGF-1, эпидермального фактора роста [54].

Все вышесказанное свидетельствует о том, что при развивающихся в ходе ишемии-реперфузии компенсаторных и патофизиологических процессах активируются различные сигнальные пути, вследствие чего их целенаправленная регуляция, в том числе пептидами инсулинового семейства, может служить многообещающей стратегией для лечения ишемических повреждений мозга.

Во время реперфузии, т.е. при восстановлении кровоснабжения, отмечается дальнейшее прогрессирование индуцированных в ходе ишемии процессов, в том числе усиление окислительного стресса, накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительная инактивация транспортных молекул, включая ключевой для жизнеспособности клеток фермент Na⁺/K⁺-АТФазу [45]. Одной из причин усиления окислительного стресса и запуска «реакции несвернутых белков», как индуктора стресса эндоплазматического ретикула, является нарушение функциональной активности ферментов антиоксидантной системы, которые исключительно важны для обеспечения выживания нейронов и глиальных клеток в постишемический период [55].

В настоящее время существует несколько подходов для лечения инсульта, которые основаны на необходимости восстановить кровоток в зоне ишемического повреждения и повысить выживаемость клеток в зоне пенумбры, окружающей очаг ишемии. Среди них тромболитическая терапия, которая должна быть проведена в течение первых 4,5 ч после возникновения симптомов ишемического инсульта [56]. Комплексная антитромбоцитарная и нейропротекторная терапия способствует снижению негативных последствий инсульта [57]. Предотвращение образования тромбов в сосудах головного мозга при ишемическом инсульте может быть осуществлено путем использования препаратов активатора тканевого плазминогена (tPA), таких как алтеплаза, которые растворяют тромбы и улучшают приток крови к структурам мозга [56]. Наряду с фармакологическими, используют хирургические подходы, в первую очередь механическую тромбэктомия, которая направлена на удаление тромба, локализованного в кровеносном сосуде [58]. При геморрагическом инсульте остановка кровотечения хирургическим путем является единственным способом эффективного лечения. Однако все эти подходы имеют серьезные ограничения, а терапевтическое окно для их применения является очень узким. Так, препараты tPA являются эффективными только в течение первых 3–4 ч после начала инсульта [58].

Нейропротекторная терапия включает использование различных по механизму действия препаратов, среди которых «депротеинизированный гемодериват крови телят» или актовегин, винпоцетин, АКТГ и родственные ему пептидные регуляторы, а также препараты, содержащие метаболиты и биологически активные вещества (инозин + никотинамид + рибофлавин + янтарная кислота, ЦДФ-холин, альфосцерат холина, сукцинат этилметилгидроксипиридина) [57]. Актовегин обладает выраженным стимулирующим действием на клеточный метаболизм [59]. Винпоцетин способствует вазодилатации, снижая агрегацию тромбоцитов и оказывая противовоспалительное действие [60]. Интраназально вводимый негормональный аналог АКТГ и другие нонапептиды обладают выраженными противовоспалительным, нейротрофическим и нейро-регенеративным действиями [61]. Однако с позиций доказательной медицины назначение нейропротекторных препаратов при терапии ишемического инсульта не является в полной мере подтвержденным, и в настоящее время отсутствуют оптимальные протоколы для такой терапии [57]. Патолофизиология инсульта сложна и включает нарушения во многих сигнальных путях, поэтому комбинации нейропротекторных агентов или препарат с множественным действием могут быть более эффективными, поскольку препятствуют развитию сразу нескольких патологических процессов. Таким образом, разработка новых фармакологических подходов для лечения ишемического инсульта по-прежнему остается актуальной задачей.

Почти полвека назад было установлено, что у пациентов с сахарным диабетом, имеющих нарушенную толерантность к глюкозе и постпрандиальную гипергликемию, вероятность развития инсульта в 2–4 раза выше, чем у пациентов с нормальным уровнем глюкозы [62]. У гипергликемических пациентов намного медленнее проходит восстановление после инсульта и существенно ухудшается неврологический исход заболевания. Обнаружено, что гипергликемия выявляется у 28% пациентов с инсультом даже при отсутствии в анамнезе сахарного диабета, причем уровень гипергликемии положительно коррелирует с тяжестью инсульта, а смертность у пациентов с сильно выраженной гипергликемией значительно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем глюкозы [62]. Впоследствии взаимосвязь между симптоматическими проявлениями гипергликемии и исходом инсульта была подтверждена другими исследователями [63]. Это, как полагают, обусловлено индуцирован-

ными гипергликемией окислительным стрессом и нейровоспалением, а также интенсификацией неферментативного гликирования белков в условиях персистентного повышения уровня глюкозы [64]. Существуют убедительные доказательства, что высокий уровень глюкозы в острой фазе инсульта является независимым предиктором увеличения размера инфаркта, неблагоприятного функционального исхода и более высокой смертности [65]. Гипергликемия также ассоциирована с менее благоприятным исходом у пациентов с острым геморрагическим инсультом и церебральным венозным тромбозом [66].

ПРИМЕНЕНИЕ ИНСУЛИНА И IGF-1 ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Поскольку гипергликемия усугубляет течение инсульта и ассоциирована с тяжелым состоянием больного, то нормализация уровня глюкозы у пациентов с гипергликемией является одним из подходов для предотвращения и лечения инсульта. Инсулин, оказывающий мощный гипогликемический эффект, в этом отношении рассматривается как препарат первой линии выбора для предотвращения инсульта у диабетических пациентов с сильно выраженной гипергликемией. Однако в этом случае речь идет о способности инсулина нормализовать уровень глюкозы в крови и глюкозный гомеостаз в целом, в то время как центральные механизмы действия гормона остаются «за скобками». В последнее время все больший интерес прикован к нейропротекторному действию гормона и его способности непосредственно влиять на структуры мозга, подвергнувшиеся ишемическому повреждению.

Первые сообщения об инсулине как потенциальном нейропротекторе при ишемическом поражении мозга появились на рубеже 1980–1990-х гг. [67–69]. В дальнейшем изучали защитное действие инсулина при моделировании ишемии как на здоровых животных, так и при экспериментальном диабете. Так, в 1992 г. было установлено, что при подкожном введении инсулина диабетическим животным еще до индукции у них ишемии не только нормализуется уровень глюкозы в крови, но и существенно улучшается исход ишемического эпизода [70]. Положительное влияние обработки инсулином на исход ишемии было продемонстрировано при различных инъекционных способах введения гормона – внутривенном [71], подкожном [72–74] и внутрибрюшинном [75, 76].

Важным вкладом в понимание роли инсулина в мозге, как нейропротектора, стала работа Voll и Auer [77], в которой авторы показали, что инсулин при периферическом введении уменьшает повреждение мозга, и этот эффект определяется не только его способностью ослаблять гипергликемию, но и непосредственным воздействием на структуры мозга. В дальнейшем, основываясь на предположении о том, что инсулин оказывает нейропротекторное воздействие на нейроны, независимо от его влияния на уровень глюкозы в крови, были предприняты исследования по изучению эффектов центрально вводимого инсулина при ишемических повреждениях головного мозга. Было установлено, что при церебральной ишемии интрацеребровентрикулярное введение инсулина эффективно в той же степени, что и периферическое введение, но, в отличие от последнего, не приводит к нежелательным гипогликемическим эпизодам [78–80]. В модели ишемии переднего мозга центральное введение инсулина не только снижало размер инфаркта мозга, но и улучшало когнитивные способности животных, нарушенные в результате ишемического поражения [79]. Изучение молекулярных механизмов защитного действия инсулина на нейроны и глиальные клетки показало, что ключевую роль в них играет антиапоптотический сигнальный путь PI3K/AKT. Активируя AKT, инсулин ингибировал выход цитохрома *c* из митохондрий, предотвращая перемещение к ним проапоптотического белка Bax [81–83] и усиливая синтез белков, в том числе ферментов антиоксидантной защиты [84, 85], в результате чего повышалась выживаемость нейронов и восстанавливались когнитивные функции у животных, перенесших ишемию мозга [82].

По имеющимся данным, инсулин способен выполнять функции вазоактивного гормона, вовлеченного в регуляцию мозгового кровотока, что иллюстрируется способностью гормона вызывать как расширение [86], так и сужение сосудов [87]. Активация AKT под действием инсулина приводит к повышению экспрессии eNOS в клетках эндотелия сосудов и, как результат, усиливает продукцию NO, важнейшего вазодилататора, что особенно важно при дефиците NO в условиях нейродегенеративных и метаболических расстройств [88, 89].

В контексте предотвращения последствий ишемии головного мозга в настоящее время широко изучается и IGF-1. Церебральная ишемия и другие повреждения мозга индуцируют экспрессию IGF-1 и IGF-1-связывающих белков (IGFBP), и это, как пола-

гают, может предотвратить или по крайней мере снизить гибель нейронов и глиальных клеток [90, 91]. При изучении последствий инсульта у людей было обнаружено, что уровень IGF-1 в момент верификации инсульта (1–10 дней после ишемического эпизода) и через 3 месяца после перенесенного инсульта положительно коррелирует с кратко- и долгосрочным восстановлением функционального состояния пациентов, в том числе с нормализацией у них когнитивных функций [92]. При моделировании одностороннего повреждения головного мозга в результате ишемии-гипоксии у крыс показано, что IGF-1 накапливается в поврежденном полушарии в течение 5 ч после воздействия, а через 3 дня наблюдается повышенная экспрессия IGF-1 в микроглии и IGFBP2 – в астроцитах, причем по всему поврежденному полушарию [90].

При интрацеребровентрикулярном введении за 1 ч или через 2 ч после проведения односторонней временной гипоксии-ишемии IGF-1 значимо снижал размер инфаркта и предотвращал массовую гибель нейронов у взрослых крыс [78]. Установлено также, что IGF-1 в суточной дозе 50 мкг на крысу, вводимый в желудочки мозга в течение 7 дней, уменьшал повреждение гиппокампа после транзиторной ишемии переднего мозга крыс, проводимой путем окклюзии сонных артерий [79]. В модели гипоксической ишемии на новорожденных крыс, которым сразу после воздействия интрацеребровентрикулярно вводили 50 мкг IGF-1 с последующими ежедневными инъекциями IGF-1 в дозе 50 мкг на крысу, зона индуцированного ишемией инфаркта была существенно меньше, чем у животных без обработки IGF-1 [93]. IGF-1 также снижал индуцированный ишемией-реперфузией апоптоз и некроз в мозге диабетических крыс [94]. Совокупность этих данных свидетельствует о том, что повреждение, вызванное ишемическим инфарктом головного мозга, может быть ослаблено или в значительной степени предотвращено при неотложном лечении ишемизированных животных с помощью различных доз IGF-1.

Нейропротекторные эффекты IGF-1 интенсивно изучаются в условиях повреждения белого вещества мозга, которое ассоциировано с тяжелыми неврологическими последствиями после перенесенной гипоксии-ишемии, особенно у новорожденных. Основной мишенью гипоксии-ишемии становятся незрелые олигодендроциты, которые участвуют в миелинизации нервных волокон. Интрацеребровентрикулярное введение IGF-1 крысам,

подвергнутым постнатальной гипоксии-ишемии, существенно снижало гибель незрелых олигодендроцитов, подавляя активность проапоптотических каспазных путей, а также улучшало миелинизацию и пролиферацию клеток, что в конечном итоге восстанавливало неврологические функции, нарушенные у крысят раннего возраста вследствие воздействия [95]. Хотя популяция незрелых олигодендроцитов в белом веществе взрослого человека относительно невелика, но имеющийся пул клеток играет важную роль в ремиелинизации после травмы или ишемии. В процессе онтогенетического развития мозга незрелые олигодендроциты мигрируют из вентрикулярной зоны к конечному месту назначения, где дифференцируются с образованием миелиновых оболочек. Однако после черепно-мозговой травмы они могут мигрировать к поврежденному участку, где способствуют восстановлению миелина [96]. В этом отношении стимуляция миграции клеток с помощью IGF-1 может быть весьма эффективной.

Поддержание функций глиальных клеток и их защита также рассматриваются, как перспективный нейропротекторный подход при инсульте, поскольку деструктивные процессы затрагивают и их в условиях ишемии. Астроциты выполняют защитную роль при недостатке кровоснабжения, окислительном стрессе и эксайтотоксичности. При патологическом изменении ионного состава межклеточной жидкости астроциты выступают в качестве буфера ионов и возбуждающих аминокислот, глутамата и аспартата [97]. IGF-1 оказывает протекторное действие на глиальные клетки. Снижение уровня IGF-1 или блокирование IGF1R в астроцитах приводит к уменьшению скорости захвата глутамата при одновременном усилении высвобождения нейромедиатора [98]. Подобные процессы, которые могут наблюдаться при инсулиновой резистентности, приводят к образованию эксайтотоксичного микроокружения вокруг нейронов, что в конечном итоге способствует повреждению тканей при инсульте. Нарушение IGF-1-опосредуемого сигналинга влечет за собой дисбаланс гомеостаза глюкозы в астроцитах, что отрицательно влияет на нейротрансмиссию и метаболическую активность нейронов, поскольку эти процессы зависят от поступающих из астроцитов метаболитов, глутамина и лактата [99]. Введение IGF-1 оказывает также противовоспалительное действие при ишемии мозга, снижая высвобождение фактора некроза опухолей- α и интерлейкина-1 β и экспрессию индуцибельной NO-синтазы [100].

IGF-1, подобно инсулину, может проявлять нейропротекторные свойства при остром ишемическом инсульте благодаря влиянию на окислительный стресс, а также присущему ему сосудорасширяющему, противовоспалительному и антитромботическому действию. Наряду с этим, IGF-1 и инсулин, действуя синергично через сходные сигнальные каскады, способны улучшать функциональные взаимосвязи между нейронами, их метаболизм, сигнальные функции и процесс ремиелинизации нервных волокон [85, 101–104].

Таким образом, полученные данные указывают на то, что инсулин и IGF-1 положительно влияют на выживаемость, рост и дифференцировку нейронов и глиальных клеток, нейрональную пластичность и контролируемые ими функции ЦНС, а также способны предотвратить нейродегенерацию и другие патологические процессы в мозге, развивающиеся после ишемии и ишемического инсульта. Это является несомненным преимуществом инсулина и IGF-1 по сравнению со многими другими препаратами, кандидатами на роль нейропротекторов при церебральной ишемии. В отличие от инсулина и IGF-1, которые действуют комплексно, мишенями других нейропротекторов, как правило, являются отдельные звенья ишемического каскада, что, как полагают, и обуславливает их низкую эффективность или отсутствие восстанавливающего эффекта на функции ЦНС при ишемическом повреждении мозга во время клинических испытаний. Однако в случае инсулина и IGF-1 сохраняются существенные проблемы в адресной доставке препаратов в зону ишемического поражения. Так, инсулин, как правило, вводят пациентам с помощью внутривенных инъекций и только в условиях выраженной гипергликемии. Однако кровоток в зоне инфаркта сильно нарушен, и это не позволяет гормону в достаточных количествах поступить в поврежденную область мозга. В дополнение к этому инсульт часто ассоциирован с метаболическими расстройствами с характерной для них инсулиновой резистентностью. Поскольку значительная часть инсулина поступает в мозг через ГЭБ с помощью рецептор-опосредуемого транспорта, то в условиях инсулиновой резистентности такой транспорт нарушен, что приводит к снижению уровня инсулина в мозге и ослаблению проникновения в него инъекционного инсулина. Так, ранее нами было показано, что уровень инсулина в ЦНС в условиях инсулиновой резистентности при ожирении и метаболическом синдроме сильно снижен [105, 106]. Интрацеребровентрикулярные

инъекции инсулина и IGF-1 в условиях клиники неприемлемы вследствие травматичности. В соответствии с этим наиболее значимой и практически реализуемой альтернативой является интраназальное введение инсулина и IGF-1.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И IGF-1 ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Интраназальный способ введения препаратов в настоящее время стал широко применяться, в том числе в клинике для доставки гормонов, ростовых факторов, синтетических фармакологических препаратов, нуклеиновых кислот и даже стволовых клеток [107]. Преимуществом интраназального введения является адресная доставка в мозг веществ, не имеющих возможности эффективно проникать через ГЭБ вследствие размера, заряда или иных физико-химических особенностей их молекул, а также имеющих низкую устойчивость в крови, высокую иммуногенность, склонность к агрегации. Интраназальное введение обеспечивает высокую биодоступность препаратов для структур мозга, быстрое достижение терапевтического эффекта, обусловленного воздействием на нейроны и глиальные клетки, отсутствие травматизации кожных покровов и сосудов и удобство в применении по сравнению с пероральным и инъекционными способами введения. Важной особенностью интраназального введения является отсутствие прохождения через печеночный барьер, что позволяет использовать существенно более низкие дозы препаратов и тем самым снижает их побочные эффекты [107]. Несомненным преимуществом можно считать лояльность пациента к такой терапии, что особенно важно для пациентов пожилого возраста и для людей с когнитивными нарушениями.

В настоящее время накоплено достаточно данных по длительному применению интраназально вводимого инсулина (ИВИ) у здоровых людей, и результаты проведенных исследований не вызывают опасений в отношении возможных нежелательных эффектов такой терапии. Напротив, большинство результатов указывает на положительное влияние ИВИ на когнитивные функции и память [108, 109]. Длительная клиническая история применения инсулина также является несомненным преимуществом. Более того, продемонстри-

рованная в конце 2000-х гг. эффективность интраназально вводимого IGF-1 животным, подвергнутым ишемии-реперфузии [95, 109], является косвенным доказательством фармакологической безопасности и эффективности интраназально вводимых пептидов инсулиновой группы.

Сравнительно недавно были описаны фармакокинетика и фармакодинамика ИВИ у грызунов [110–112]. После распыления в носовой полости инсулин попадает на слизистую оболочку носа, где он транспортируется в мозг внутриклеточным путем с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, а также параклеточным или трансклеточным путями. Все эти пути объединяет способность инсулина распространяться вдоль обонятельного и тройничного нервов, по которым гормон быстро распределяется в вентральном и дорсальном направлениях. Максимальные значения концентрации инсулина через 15–30 мин после его введения обнаруживаются в обонятельных луковицах, стриатуме, черной субстанции, стволе мозга, мозжечке и в меньших количествах — в гиппокампе и коре мозга [110, 111]. Содержание инсулина в мозге постепенно снижается, но остается значимо повышенным через 6 ч после введения [110]. Увеличение концентрации инсулина закономерно обнаруживается в спинномозговой жидкости, при этом ИВИ заметно не снижает уровень глюкозы на периферии, т.е. лишен выраженного гипогликемического эффекта, характерного для инъекционных форм гормонов [111, 112].

Попадая в ЦНС, инсулин связывается с INSR, что приводит к активации каскада IRS/PI3K/AKT и других сигнальных путей. Об этом свидетельствует увеличение содержания Ser⁴⁷³-фосфорилированной формы AKT в обонятельных луковицах, коре мозга, гиппокампе и черной субстанции через 15–30 мин после интраназального введения гормона, за которым, однако, уже через 60 мин следует снижение содержания активированной формы AKT [110, 111].

В ряде исследований продемонстрирован защитный эффект интраназального введения IGF-1 животным с очаговой и глобальной ишемией [95, 113–118]. Их результаты обобщены в таблице. Так, Liu et al. [113, 114, 118] изучали эффект различных доз интраназально вводимого IGF-1 (37,5; 75 и 150 мкг) на крысах с моделью окклюзии средней мозговой артерии (МКАО). IGF-1 был наиболее эффективен в дозе 150 мкг, его введение вызывало уменьшение объема инфаркта мозга, улучшало

Эффекты интраназально вводимых инсулина и IGF-1 при ишемии головного мозга

№	Схема введения	Вид животного	Эффекты	Ссылка
1	инсулин (0,5; 1,0 и 2,0 Ед./мышь) вводили дважды в день с 1-го дня после операции и до конца	мыши C57BL/6J (самцы, 6–8 недель)	инсулин (1,0 Ед./мышь) снижал смертность, улучшал неврологические функции, уменьшал отек мозга и проницаемость гематоэнцефалического барьера, ослаблял постишемическую нейродегенерацию	[122]
2	0,5 Ед. инсулина/крыса однократно за 1 ч до ишемии	крысы Wistar (самцы, 3–4 месяца)	нормализация экспрессии генов каталазы, супероксиддисмутазы 1-го и 2-го типов в коре мозга крыс после ишемии-реперфузии	[123]
3	0,25–0,5 Ед. инсулина/крыса однократно за 1 ч до ишемии	крысы Wistar (самцы, 3–4 месяца)	инсулин (0,5 Ед./крыса) снижал показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ), предотвращал снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в коре мозга крыс	[124]
4	0,5 Ед. инсулина/крыса однократно за 1 ч до ишемии	крысы Wistar (самцы, 3–4 месяца)	снижение показателей ПОЛ, увеличение уровня общего глутатиона в коре мозга контрольных и ишемизированных крыс	[125]
5	0,25 Ед. инсулина/крыса однократно за 1 ч до ишемии	крысы Wistar (самцы, 3–4 месяца)	снижение уровня оснований Шиффа, повышение активности Na^+/K^+ -АТФазы и экспрессии $\alpha 2$ -субъединицы фермента в коре мозга крыс; инсулин и альфа-токоферол усиливают защитное действие друг друга	[126, 127]
6	37,5 и 150 мкг IGF-1/крыса, 10 мин, 24 ч и 48 ч после МСАО	крысы Sprague–Dawley, (самцы, масса 250–303 г)	обработка крыс 150 мкг IGF-1 снижала размер инфаркта, улучшала моторные, сенсорные и вестибулярные функции	[113]
7	75 мкг/крыса IGF-1, 10 мин, 24 ч и 48 ч после МСАО	крысы Sprague–Dawley, (самцы, масса 243–280 г)	введение 75 мкг IGF-1 (суммарно 225 мкг IGF-1 в течение 48 ч) снижало объем инфаркта и отек мозга и улучшало неврологические функции	[114]
8	150 мкг/крыса IGF-1, однократно через 2, 4 и 6 ч после МСАО. Вторая доза – через 24 ч; третья доза – через 48 ч	крысы Sprague–Dawley, (самцы, масса 242–290 г)	введение IGF-1 снижало размеры инфаркта мозга через 2 и 4 ч после МСАО; введение через 6 ч после инсульта снижало некроз клеток; установлен размер терапевтического окна для интраназального IGF-1	[118]
9	50 мкг/крыса IGF-1 сразу после гипоксии-ишемии, через 1 или через 2 ч	крысята Sprague–Dawley 7-го дня жизни (P7)	введение IGF-1 сразу после и через 1 ч после гипоксии-ишемии снижало повреждение мозга, улучшало неврологические функции, выявлены антиапоптотический и пролиферативный эффекты	[95]
10	1 мкг/мышь IGF-1 сразу после начала реперфузии	мыши C57BL/6 (самцы, 20–25 г)	улучшение соматосенсорных и локомоторных функций; при интраназальном пути доставки показаны самые высокие концентрации и самые ранние пиковые концентрации в мозге по сравнению с другими типами инъекций; эритропоэтин и IGF-1 усиливали действие друг друга	[115]
11	500 нг/мышь IGF-1 вводили на 3, 5 и 7 дни после окклюзии	мыши C57BL/6 (самцы)	усиление нейрогенеза и ангиогенеза, улучшение локального мозгового кровотока; IGF-1 усиливал действие мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при их совместном интраназальном введении	[117]

Примечание. ПОЛ – перекисное окисление липидов; МСАО – модель окклюзии средней мозговой артерии (middle cerebral artery occlusion).

моторные, сенсорные, рефлекторные и вестибуломоторные функции у крыс после двухчасовой МСАО. В другой работе те же авторы показали, что интраназальное введение IGF-1 в суммарной дозе 225 мкг в течение 48 ч также способствует уменьшению объема инфаркта и отека полушарий, предотвращая неврологический дефицит в условиях МСАО [114]. При этом защитное действие IGF-1 сохранялось в течение 6 ч после МСАО, что позволило оценить размер терапевтического окна для интраназально вводимого IGF-1 [118].

Примечательно, что уровни IGF-1 в крови и тканях снижаются с возрастом. В соответствии с этим, основываясь на данных об отрицательной корреляции между уровнями циркулирующего в крови IGF-1 и частотой инсульта головного мозга [119], можно предположить, что неинвазивное введение IGF-1 пожилым пациентам будет весьма эффективным для предотвращения инсульта и ослабления его негативных последствий. Следует, однако, отметить, что IGF-1, являясь мощным стимулятором пролиферации клеток, характеризуется высоким онкогенным потенциалом и возможные последствия от его применения мало изучены, в отличие от таковых для ИВИ.

Описанное положительное влияние интраназально вводимого IGF-1 на функции ЦНС у животных, подвергнутых ишемии-реперфузии, позволило высказать гипотезу о том, что нейропротекторный эффект в условиях ишемического инсульта будет проявлять также ИВИ [102]. Это предположение базируется как на выявлении нейропротекторных, антиапоптотических и противовоспалительных эффектов ИВИ, полученных при его использовании у животных с экспериментальными моделями нейродегенерации и в условиях клиники при лечении пациентов с болезнью Альцгеймера [120, 121], так и на сходстве молекулярных механизмов и мишеней действия инсулина и IGF-1 в ЦНС [107]. Несмотря на обоснованность и логичность этого предположения, до настоящего времени работы, в которых изучали влияние ИВИ и его нейропротекторный эффект при ишемии головного мозга, единичны. Среди них выполненное в 2022 г. исследование Zhu et al. [122], в котором использовали ИВИ для коррекции ишемических повреждений при геморрагическом инсульте у мышей, и наши работы 2018–2022 гг., в которых изучалась способность ИВИ нормализовать метаболические процессы и ослаблять окислительный стресс при двухсторонней глобальной ишемии переднего мозга у крыс [123–127] (таблица).

Изучая нейропротекторные свойства ИВИ при ишемии, китайские ученые осуществляли оптимизацию доз ИВИ, которые позволяют с наибольшей эффективностью восстанавливать функции мозга при геморрагическом инсульте у мышей [122]. Обнаружено, что ИВИ эффективен в дозе 1,0 Ед./мышь, в то время как в более высокой дозе (2,0 Ед./мышь) он не продемонстрировал значимого ослабления нейродегенеративных процессов. Защитный эффект инсулина при ишемии был обусловлен активацией им 3-фосфоинозитидного пути, включающего АКТ и нижележащую GSK3 β . Было высказано предположение, что инсулин регулирует кровоток в сосудах головного мозга дозозависимо, и чрезмерное расширение сосудов в зоне геморрагии при использовании его высоких доз может только усилить повреждение тканей мозга. В этой связи необходимо отметить, что инсулин может оказывать на тонус сосудов разнонаправленные влияния, выступая в качестве вазодилататора [86] и вазоконстриктора [87].

Нами были проведены системные исследования эффективности ИВИ при ишемии мозга, в том числе в условиях двухсторонней глобальной ишемии переднего мозга [123–127]. Впервые было установлено, что ИВИ оказывает антиоксидантное и нейропротекторное воздействие на мозг ишемизированных крыс в дозах 0,25 и 0,5 Ед. на крысу, а также предотвращает окислительную инактивацию Na⁺/K⁺-АТФазы, препятствуя накоплению продуктов ПОЛ и повышая уровень общего глутатиона в коре мозга крыс, перенесших ишемию-реперфузию. Антиоксидантное действие ИВИ на ткани мозга осуществлялось на уровне регуляции экспрессии генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты, что выражалось в ИВИ-индуцированном повышении экспрессии генов, кодирующих каталазу и супероксиддисмутазы 1-го и 2-го типов в коре головного мозга [123]. Нормализация процесса ПОЛ может быть опосредована повышением под влиянием ИВИ уровня общего глутатиона в мозге, который играет ключевую роль в антиоксидантной защите нейронов и глиальных клеток [125]. В пользу этого свидетельствует то, что в опытах *in vitro* на первичной культуре нейронов коры мозга другими авторами было показано, что инсулин способен повышать уровень общего глутатиона как в контрольных клетках, так и в клетках, подвергнутых окислительному стрессу, и в основе этого лежит усиление активности глутатионредуктазы и снижение активности глутатионпероксидазы [128]. Сходная ситуация может реализовываться в мозге грызунов при ишемии-реперфузии головного мозга.

В изученной нами модели ишемии-реперфузии выраженным защитным действием обладал инсулин в минимальной дозе 0,25 Ед. на крысу [124, 126, 127], что значительно ниже эффективной дозы ИВИ, описанной в работе Zhu et al. (1,0 Ед. на мышь) [122]. Стоит подчеркнуть, что при внутривенном или подкожном введении инсулина его защитный эффект проявлялся при значительно более высоких дозах, составляющих 4 или даже 12 Ед./животное [89]. Используемые нами эффективные дозы ИВИ сопоставимы с таковыми при интрацеребровентрикулярном введении гормона. В этой связи необходимо упомянуть тот факт, что ИВИ в дозах 0,25–0,5 Ед. на крысу отчетливо восстанавливал метаболические и гормональные показатели, а также когнитивные функции при экспериментальном сахарном диабете [129–131] и метаболическом синдроме [132].

Исследования последних лет направлены на изучение возможного аддитивного действия ИВИ и интраназально вводимого IGF-1 с другими потенциальными нейропротекторами. Нами показано, что при совместном применении с α -токоферолом, биоактивным компонентом витамина Е, нейропротекторный эффект ИВИ усиливается, и это указывает на синергичность действия препаратов [126]. Иллюстрацией этого является значительное повышение антиоксидантного эффекта ИВИ в присутствии α -токоферола. Эксперименты *in vivo* были подкреплены данными *in vitro* по взаимному усилению нейропротекторных эффектов инсулина и α -токоферола в первичной культуре кортикальных нейронов, подвергнутых окислительному стрессу, индуцированному перекисью водорода [126]. Fletcher et al. [115] показали, что интраназально вводимый цитокин эритропоэтин оказывает мощный нейропротекторный эффект на структуры мозга в случае его совместного применения с IGF-1 при ишемическом инсульте. Об этом свидетельствует значимое уменьшение объема инфаркта мозга и улучшение неврологической функции у мышей в течение 90 дней после окклюзии средней мозговой артерии. Изучение распределения [125 I] IGF-1 после его интраназального введения в ишемизированном мозге позволило установить, что этот ростовый фактор обнаруживается в ишемической зоне мозга всего через 20 мин после введения и в дальнейшем накапливается в ней. И, что особенно важно, при интраназальном введении достигается более высокий уровень IGF-1 в мозге как здоровых, так и ишемизированных животных по сравнению с внутривенным, под-

кожным или внутрибрюшинным способами введения IGF-1 [115]. Эти данные свидетельствуют о высокой биодоступности различных отделов мозга при интраназальном введении пептидов инсулиновой группы, а также о более высокой эффективности такого способа доставки инсулиновых пептидов в мозг в сравнении с инъекционными способами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемия тканей головного мозга может возникнуть при различных по этиологии и патогенезу заболеваниях и состояниях. Резкое снижение кровоснабжения и энергетический дефицит в ткани мозга приводят к запуску множества компенсаторных механизмов, направленных на поддержание, хотя бы временное, жизнеспособности нейронов и снижение интенсивности провоспалительных и апоптотических процессов в ЦНС. Важную роль в них играют сигнальные каскады, индуцированные широким спектром гормонов, ростовых факторов, цитокинов, наделенных свойствами нейропротекторов и нейромодуляторов. Инсулин и IGF-1 можно рассматривать в качестве ключевых кандидатов на роль нейропротекторных и нейротрофических факторов, защищающих мозг от повреждений и последующей лавинообразной нейродегенерации при инсульте. Плейотропные эффекты, реализуемые инсулином и IGF-1 в ЦНС, делают их участниками целого ряда патологических и регенерационных процессов, которые разворачиваются сразу после ишемического инсульта. Характерная для инсулина и IGF-1 множественность действий становится их неоспоримым преимуществом по сравнению со многими другими нейропротекторами, действие которых направлено на конкретные звенья патологических процессов и регуляторных каскадов. Вследствие этого применение таких узконаправленных, высокоспецифичных нейропротекторов характеризуется их низкой эффективностью в условиях, когда вследствие массовой гибели нейронов и глиальных клеток после ишемии нарушаются множественные интегративные взаимосвязи между различными сигнальными путями и процессами, а запуск программы восстановления функций ЦНС требуют согласованной их коррекции. Можно полагать, что инсулин и его функциональный гомолог IGF-1 в этом случае могут стать незаменимыми.

Инсулин и IGF-1 присутствуют в ЦНС на протяжении всего онтогенеза и даже, в случае



Рис. 2. Молекулярные и физиологические эффекты интраназально вводимых инсулина и IGF-1 при ишемии головного мозга. Ins – инсулин; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1; INSR – рецептор инсулина; IGF1R – рецептор IGF-1; IRS – белки-субстраты рецептора инсулина; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PKC – протеинкиназа C; GLUT – инсулин-зависимый глюкозный транспортер; AKT – протеинкиназа B; GSK3 – киназа-3 гликогенсинтазы; FOXO1 – транскрипционный фактор O1 семейства Forkhead; mTORC1 – мишень рапамицинового комплекса 1 млекопитающих; ERK/MAPK – митогенактивируемые протеинкиназы; eNOS – эндотелиальная форма NO-синтазы

инсулина, могут вырабатываться в мозге на ранних стадиях развития организма. Тем самым они не являются чужеродными молекулами для мозга, и потому их введение можно рассматривать как естественный процесс восстановления зависимых от них физиологических процессов, в отличие, например, от введения многих регуляторных молекул, в том числе синтетических, которые могут взаимодействовать с нецелевыми мишенями и тем самым необратимо менять жизненно важные функции мозга. Одним из наиболее эффективных способов доставки инсулина и IGF-1 в мозг является интраназальный способ их введения (рис. 2).

Естественность и безопасность терапии ИВИ основывается на большом положительном опыте его применения при лечении болезни Альцгеймера и некоторых других нейродегенеративных заболеваний, а также при коррекции сахарного диабета, травм головного мозга и других патологических состояниях нервной системы. Преимуществами интраназального способа доставки является безболезненность, отсутствие необходимости в специальном оборудовании или стерилизации. Интраназальное введение позволяет доставить препарат непосредственно в мозг неинвазивно и быстрее, чем при периферическом способе введения. Такое введение улучшает

проникновение препарата в ЦНС, минуя ГЭБ, а предотвращение биodeградации препарата в печени и почках, а также отсутствие риска иммунной реакции на него заметно снижают фармакологически релевантную дозу и уменьшают вероятность побочных эффектов [107]. При интраназальном пути доставки не наблюдается проникновения препарата в системный кровоток, что особенно важно при использовании инсулина, поскольку позволяет предотвратить риск развития опасной для жизни гипогликемии [108, 110]. В случае IGF-1 интраназальное введение позволяет избежать непосредственного воздействия этого мощного митогена на периферические ткани и тем самым минимизирует его возможный онкогенный потенциал.

Существующие исследования ИВИ и интраназально вводимого IGF-1, однако, не лишены недостатков. Большинство из них проведены с использованием здоровых взрослых, не сенильного возраста, не имеющих коморбидных заболеваний, не страдающих атеросклерозом, сахарным диабетом или гипертонией, т.е. не имеющих выраженной предрасположенности к инсульту. Как отмечалось выше, имеется положительная взаимосвязь между тяжестью и продолжительностью этих патологических состояний и повышенным риском возникновения инсульта [45]. Ассоциацией STAIR (Stroke Treatment Academic Industry Roundtable) опубликованы рекомендации, которых необходимо придерживаться при поиске и валидации нейропротек-

торных препаратов для лечения инсульта [133]. Эти рекомендации включают изучение дозозависимого эффекта препаратов и длительности терапевтического окна, необходимость проверки на различных моделях ишемии и ишемии-реперфузии, использование нескольких видов животных (грызуны, кошки, приматы), изучение влияния возраста, пола и других факторов. Таким образом, в настоящее время существует значимый пробел в области фармакологии и фармакокинетики ИВИ и интраназально вводимого IGF-1 при лечении инсульта, несмотря на их потенциальную эффективность и безопасность. Именно поэтому необходимы дальнейшие исследования на животных моделях, которые позволят получить убедительные доказательства эффективности ИВИ и интраназально вводимого IGF-1 в качестве нейропротекторов при инсульте и ишемии головного мозга.

Вклад авторов. И.И.З., И.О.З. — анализ литературы, написание текста статьи, подготовка иллюстраций; А.О.Ш., Н.Ф.А. — концептуализация, редактирование текста статьи, руководство.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00967-23-00.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soto, M., Cai, W., Konishi, M., and Kahn, C. R. (2019) Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6379-6384, doi: 10.1073/pnas.1817391116.
2. Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. J. (1979) Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents, *J. Clin. Invest.*, **64**, 636-642, doi: 10.1172/JCI109504.
3. Rhea, E. M., and Banks, W. A. (2019) Role of the blood-brain barrier in central nervous system insulin resistance, *Front. Neurosci.*, **13**, 521, doi: 10.3389/fnins.2019.00521.
4. Beddows, C. A., and Dodd, G. T. (2021) Insulin on the brain: The role of central insulin signalling in energy and glucose homeostasis, *J. Neuroendocrinol.*, **33**, e12947, doi: 10.1111/jne.12947.
5. Devaskar, S. U., Giddings, S. J., Rajakumar, P. A., Carnaghi, L. R., Menon, R. K., and Zahm, D. S. (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells, *J. Biol. Chem.*, **269**, 8445-8454, doi: 10.1016/S0021-9258(17)37214-9.
6. Devaskar, S. U., Singh, B. S., Carnaghi, L. R., Rajakumar, P. A., and Giddings, S. J. (1993) Insulin II gene expression in rat central nervous system, *Regul. Pept.*, **48**, 5563, doi: 10.1016/0167-0115(93)90335-6.
7. Schechter, R., Whitmire, J., Wheet, G.S., Beju, D., Jackson, K. W., Harlow, R., and Gavin, J. R., 3rd (1994) Immunohistochemical and in situ hybridization study of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures, *Brain Res.*, **636**, 9-27, doi: 10.1016/0006-8993(94)90170-8.
8. Gerozissis, K. (2008) Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and

- metabolic pathologies, *Eur. J. Pharmacol.*, **585**, 38-49, doi: 10.1016/j.ejphar.2008.01.050.
9. Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat, *Nature*, **272**, 827-829, doi: 10.1038/272827a0.
 10. Escribano, O., Beneit, N., Rubio-Longás, C., López-Pastor, A. R., and Gómez-Hernández, A. (2017) The role of insulin receptor isoforms in diabetes and its metabolic and vascular complications, *J. Diabetes Res.*, **2017**, 1403206, doi: 10.1155/2017/1403206.
 11. De Meyts, P. (2008) The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 376-384, doi: 10.1016/j.tibs.2008.06.003.
 12. Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease, *Endocr. Rev.*, **30**, 586-623, doi: 10.1210/er.2008-0047.
 13. White, M. F., and Kahn, C. R. (2021) Insulin action at a molecular level – 100 years of progress, *Mol. Metab.*, **52**, 101304, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101304.
 14. Copps, K. D., and White, M. F. (2012) Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2, *Diabetologia*, **55**, 2565-2582, doi: 10.1007/s00125-012-2644-8.
 15. Razzini, G., Ingrosso, A., Brancaccio, A., Sciacchitano, S., Esposito, D. L., and Falasca, M. (2000) Different subcellular localization and phosphoinositides binding of insulin receptor substrate protein pleckstrin homology domains, *Mol. Endocrinol.*, **14**, 823-836, doi: 10.1210/mend.14.6.0486.
 16. Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., and White, M. F. (2002) Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action, *J. Biol. Chem.*, **277**, 1531-1537, doi: 10.1074/jbc.M101521200.
 17. Bakke, J., and Haj, F. G. (2015) Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **37**, 58-65, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.020.
 18. Dodd, G. T., Xirouchaki, C. E., Eramo, M., Mitchell, C. A., Andrews, Z. B., Henry, B. A., Cowley, M. A., and Tiganis, T. (2019) Intranasal targeting of hypothalamic PTP1B and TCPTP reinstates leptin and insulin sensitivity and promotes weight loss in obesity, *Cell Rep.*, **28**, 2905-2922.e5, doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.019.
 19. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 329-341, doi: 10.1038/nrm2882.
 20. Levenga, J., Wong, H., Milstead, R. A., LaPlante, L. E., Hoeffler, C. A. (2021) Immunohistological examination of AKT isoforms in the brain: cell-type specificity that may underlie AKT's role in complex brain disorders and neurological disease, *Cereb. Cortex Commun.*, **2**, tgab036, doi: 10.1093/texcom/tgab036.
 21. Manning, B. D., and Toker, A. (2017) AKT/PKB signaling: navigating the network, *Cell*, **169**, 381-405, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
 22. Hemmings, B. A., and Restuccia, D. F. (2012) PI3K-PKB/Akt pathway, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011189, doi: 10.1101/cshperspect.a011189. Erratum in: (2015) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a026609, doi: 10.1101/cshperspect.a026609.
 23. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Bertrand, F. E., Davis, N. M., Sokolosky, M., Abrams, S. L., Montalto, G., D'Assoro, A. B., Libra, M., Nicoletti, F., Maestro, R., Basccke, J., Rakus, D., Gizak, A., Demidenko, Z. N., Cocco, L., Martelli, A. M., and Cervello, M. (2014) GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer, *Oncotarget*, **5**, 2881-2911, doi: 10.18632/oncotarget.2037.
 24. Beurel, E., Grieco, S. F., and Jope, R. S. (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases, *Pharmacol. Ther.*, **148**, 114-131, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
 25. Brown, A. K., and Webb, A. E. (2018) Regulation of FOXO factors in mammalian cells, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **127**, 165-192, doi: 10.1016/bs.ctdb.2017.10.006.
 26. Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., and Ahmadiani, A. (2013) Insulin in the brain: sources, localization and functions, *Mol. Neurobiol.*, **47**, 145-171, doi: 10.1007/s12035-012-8339-9.
 27. Wang, X., and Proud, C. G. (2006) The mTOR pathway in the control of protein synthesis, *Physiology (Bethesda)*, **21**, 362-369, doi: 10.1152/physiol.00024.2006.
 28. Stoica, L., Zhu, P. J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S. C., and Costa-Mattioli, M. (2011) Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3791-3796, doi: 10.1073/pnas.1014715108.
 29. Trueba-Saiz, A., Fernandez, A. M., Nishijima, T., Mecha, M., Santi, A., Munive, V., and Aleman, I. T. (2017) Circulating insulin-like growth factor I regulates its receptor in the brain of male mice, *Endocrinology*, **158**, 349-355, doi: 10.1210/en.2016-1468.
 30. Baker, A. M., Batchelor, D. C., Thomas, G. B., Wen, J. Y., Rafiee, M., Lin, H., and Guan, J. (2005) Central penetration and stability of N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I, glycine-proline-glutamate in adult rat, *Neuropeptides*, **39**, 81-87, doi: 10.1016/j.npep.2004.11.001.
 31. Guan, J. (2011) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) derived neuropeptides, a novel strategy for the

- development of pharmaceuticals for managing ischemic brain injury, *CNS Neurosci. Ther.*, **17**, 250-255, doi: 10.1111/j.1755-5949.2009.00128.x.
32. Lewitt, M. S., and Boyd, G. W. (2019) The role of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins in the nervous system, *Biochem. Insights*, **12**, 1178626419842176, doi: 10.1177/1178626419842176.
33. Rotwein, P., Burgess, S. K., Milbrandt, J. D., and Krause, J. E. (1988) Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 265-269, doi: 10.1073/pnas.85.1.265.
34. Whittaker, J., Groth, A. V., Mynarcik, D. C., Pluzek, L., Gadsbøll, V. L., and Whittaker, L. J. (2001) Alanine scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site, *J. Biol. Chem.*, **276**, 43980-43986, doi: 10.1074/jbc.M102863200.
35. Drakas, R., Tu, X., and Baserga, R. (2004) Control of cell size through phosphorylation of upstream binding factor 1 by nuclear phosphatidylinositol 3-kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9272-9276, doi: 10.1073/pnas.0403328101.
36. Shpakov, A. O., Derkach, K. V., and Berstein, L. M. (2015) Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases, *Future Sci. OA*, **1**, FSO25, doi: 10.4155/fso.15.23.
37. Yuan, H., Chen, R., Wu, L., Chen, Q., Hu, A., Zhang, T., Wang, Z., and Zhu, X. (2015) The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice, *Mol. Neurobiol.*, **51**, 512-522, doi: 10.1007/s12035-014-8717-6.
38. Agis-Balboa, R. C., and Fischer, A. (2014) Generating new neurons to circumvent your fears: the role of IGF signaling, *Cell Mol. Life Sci.*, **71**, 21-42, doi: 10.1007/s00018-013-1316-2.
39. Gubbi, S., Quipildor, G. F., Barzilai, N., Huffman, D. M., and Milman, S. (2018) 40 YEARS of IGF1: IGF1: the Jekyll and Hyde of the aging brain, *J. Mol. Endocrinol.*, **61**, T171-T185, doi: 10.1530/JME-18-0093.
40. Wrigley, S., Arafa, D., and Tropea, D. (2017) Insulin-like growth factor 1: at the crossroads of brain development and aging, *Front. Cell Neurosci.*, **11**, 14, doi: 10.3389/fncel.2017.00014.
41. Memezawa, H., Minamisawa, H., Smith, M. L., and Siesjö, B. K. (1992) Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat, *Exp. Brain Res.*, **89**, 67-78, doi: 10.1007/BF00229002.
42. Gidö, G., Kristián, T., and Siesjö, B. K. (1997) Extracellular potassium in a neocortical core area after transient focal ischemia, *Stroke*, **28**, 206-210, doi: 10.1161/01.str.28.1.206.
43. Kristián, T., Gidö, G., Kuroda, S., Schütz, A., and Siesjö, B. K. (1998) Calcium metabolism of focal and penumbral tissues in rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion, *Exp. Brain Res.*, **120**, 503-509, doi: 10.1007/s002210050424.
44. Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci.*, **22**, 391-397, doi: 10.1016/s0166-2236(99)01401-0.
45. Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., and Moghaddam, H. F. (2017) Pathogenic mechanisms following ischemic stroke, *Neurol. Sci.*, **38**, 1167-1186, doi: 10.1007/s10072-017-2938-1.
46. George, P. M., and Steinberg, G. K. (2015) Novel stroke therapeutics: unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments, *Neuron*, **87**, 297-309, doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.041.
47. Zhang, F. X., Rubin, R., and Rooney, T. A. (1998) N-methyl-D-aspartate inhibits apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cerebellar granule neurons – a role for insulin receptor substrate-1 in the neurotrophic action of N-methyl-D-aspartate and its inhibition by ethanol, *J. Biol. Chem.*, **273**, 26596-26602, doi: 10.1074/jbc.273.41.26596.
48. Endo, H., Nito, C., Kamada, H., Nishi, T., and Chan, P. H. (2006) Activation of the Akt/GSK3 β signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **26**, 1479-1489, doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600303.
49. Soriano, F. X., Papadia, S., Hofmann, F., Hardingham, N. R., Bading, H., and Hardingham, G. E. (2006) Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability, *J. Neurosci.*, **26**, 4509-4518, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0455-06.2006.
50. Qin, C., Yang, S., Chu, Y. H., Zhang, H., Pang, X. W., Chen, L., Zhou, L. Q., Chen, M., Tian, D. S., and Wang, W. (2022) Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **7**, 215, doi: 10.1038/s41392-022-01064-1. Erratum in: *Signal Transduct. Target. Ther.*, **7**, 278.
51. Ahad, M. A., Kumaran, K. R., Ning, T., Mansor, N. I., Effendy, M. A., Damodaran, T., Lingam, K., Wahab, H. A., Nordin, N., Liao, P., Müller, C. P., and Hassan, Z. (2020) Insights into the neuropathology of cerebral ischemia and its mechanisms, *Rev. Neurosci.*, **31**, 521-538, doi: 10.1515/revneuro-2019-0099.
52. Semenza, G. L. (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1, *Physiology (Bethesda)*, **24**, 97-106, doi: 10.1152/physiol.00045.2008.
53. Sharp, F., and Bernaudin, M. (2004) HIF1 and oxygen sensing in the brain, *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 437-448, doi: 10.1038/nrn1408.
54. Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z., and Du, G. (2018) PI3K/Akt and HIF 1 signaling pathway in

- hypoxia ischemia (Review), *Mol. Med. Rep.*, **18**, 3547-3554, doi: 10.3892/mmr.2018.9375.
55. Sanderson, T. H., Reynolds, C. A., Kumar, R., Przyklenk, K., and Hüttemann, M. (2013) Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation, *Mol. Neurobiol.*, **47**, 9-23, doi: 10.1007/s12035-012-8344-z.
 56. Wardlaw, J. M., Murray, V., Berge, E., and del Zoppo, G. J. (2014) Thrombolysis for acute ischaemic stroke, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2014**, CD000213, doi: 10.1002/14651858.CD000213.pub3.
 57. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных (2022) Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых, Москва.
 58. Emberson, J., Lees, K. R., Lyden, P., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., Brott, T., Cohen, G., Davis, S., Donnan, G., Grotta, J., Howard, G., Kaste, M., Koga, M., von Kummer, R., Lansberg, M., Lindley, R. I., Murray, G., Olivot, J. M., Parsons, M., Tilley, B., Toni, D., Toyoda, K., Wahlgren, N., Wardlaw, J., Whiteley, W., del Zoppo, G. J., Baigent, C., Sandercock, P., and Hacke, W. (2014) Stroke Thrombolysis Trialists' Collaborative Group. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials, *Lancet*, **384**, 1929-1935, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60584-5.
 59. Guekht, A., Skoog, I., Edmundson, S., Zakharov, V., and Korczyn, A. D. (2017) ARTEMIDA Trial (a Randomized Trial of Efficacy, 12 Months International Double-Blind Actovegin): A randomized controlled trial to assess the efficacy of actovegin in poststroke cognitive impairment, *Stroke*, **48**, 1262-1270, doi: 10.1161/STROKEAHA.116.014321.
 60. Zhang, C., and Yan, C. (2020) Updates of recent vinpocetine research in treating cardiovascular diseases, *J. Cell Immunol.*, **2**, 211-219, doi: 10.33696/immunology.2.045.
 61. Gusev, E. I., Skvortsova, V. I., and Chukanova, E. I. (2005) Semax in prevention of disease progress and development of exacerbations in patients with cerebrovascular insufficiency [in Russian], *Zhurn. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **105**, 35-40.
 62. Melamed, E. (1976) Reactive hyperglycaemia in patients with acute stroke, *J. Neurol. Sci.*, **29**, 267-275, doi: 10.1016/0022-510x(76)90176-3.
 63. Capes, S. E., Hunt, D., Malmberg, K., Pathak, P., and Gerstein, H. C. (2001) Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview, *Stroke*, **32**, 2426-2432, doi: 10.1161/hs1001.096194.
 64. Zhang, Z., Yan, J., and Shi, H. (2013) Hyperglycemia as a risk factor of ischemic stroke, *J. Drug Metab. Toxicol.*, **4**, 153, doi: 10.4172/2157-7609.1000153.
 65. Piironen, K., Putaala, J., Rosso, C., and Samson, Y. (2012) Glucose and acute stroke: evidence for an interlude, *Stroke*, **43**, 898-902, doi: 10.1161/STROKEAHA.111.631218.
 66. Saxena, A., Anderson, C. S., Wang, X., Sato, S., Arima, H., Chan, E., Muñoz-Venturelli, P., Delcourt, C., Robinson, T., Stapf, C., Lavados, P. M., Wang, J., Neal, B., Chalmers, J., and Heeley, E. (2016) INTERACT2 Investigators. Prognostic significance of hyperglycemia in acute intracerebral hemorrhage: The INTERACT2 study, *Stroke*, **47**, 682-688, doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011627.
 67. Voll, C. L., and Auer, R. N. (1988) The effect of postischemic blood glucose levels on ischemic brain damage in the rat, *Ann. Neurol.*, **24**, 638-646, doi: 10.1002/ana.410240508.
 68. Voll, C. L., Whishaw, I. Q., and Auer, R. N. (1989) Postischemic insulin reduces spatial learning deficit following transient forebrain ischemia in rats, *Stroke*, **20**, 646-651, doi: 10.1161/01.str.20.5.646. Erratum in: (1989), *Stroke*, **20**, 1118.
 69. Hamilton, M. G., Tranmer, B. I., and Auer, R. N. (1995) Insulin reduction of cerebral infarction due to transient focal ischemia, *J. Neurosurg.*, **82**, 262-268, doi: 10.3171/jns.1995.82.2.0262.
 70. Warner, D. S., Gionet, T. X., Todd, M. M., and McAllister, A. M. (1992) Insulin-induced normoglycemia improves ischemic outcome in hyperglycemic rats, *Stroke*, **23**, 1775-1780, discussion 1781, doi: 10.1161/01.str.23.12.1775.
 71. Guyot, L. L., Diaz, F. G., O'Regan, M. H., Ren, J., and Phillis, J. W. (2000) The effect of intravenous insulin on accumulation of excitotoxic and other amino acids in the ischemic rat cerebral cortex, *Neurosci. Lett.*, **288**, 61-65, doi: 10.1016/s0304-3940(00)01168-x.
 72. Fukuoka, S., Yeh, H., Mandybur, T. I., and Tew, J. M. Jr. (1989) Effect of insulin on acute experimental cerebral ischemia in gerbils, *Stroke*, **20**, 396-399, doi: 10.1161/01.str.20.3.396.
 73. Meden, P., Andersen, M., Overgaard, K., Rasmussen, R. S., and Boysen, G. (2002) The effects of early insulin treatment combined with thrombolysis in rat embolic stroke, *Neurol. Res.*, **24**, 399-404, doi: 10.1179/016164102101200096.
 74. Huang, S. S., Lu, Y. J., Huang, J. P., Wu, Y. T., Day, Y. J., and Hung, L. M. J. (2014) The essential role of endothelial nitric oxide synthase activation in insulin-mediated neuroprotection against ischemic stroke in diabetes, *Vasc. Surg.*, **59**, 483-491, doi: 10.1016/j.jvs.2013.03.023.
 75. Izumi, Y., Pinard, E., Roussel, S., and Seylaz, J. (1992) Insulin protects brain tissue against focal ischemia in rats, *Neurosci. Lett.*, **144**, 121-123, doi: 10.1016/0304-3940(92)90730-u.
 76. Fanne, R. A., Nassar, T., Heyman, S. N., Hijazi, N., and Higazi, A. A. (2011) Insulin and glucagon share

- the same mechanism of neuroprotection in diabetic rats: role of glutamate, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301**, R668-R673, doi: 10.1152/ajpregu.00058.2011.
77. Voll, C. L., and Auer, R. N. (1991) Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **11**, 1006-1014, doi: 10.1038/jcbfm.1991.168.
 78. Guan, J., Williams, C., Gunning, M., Mallard, C., and Gluckman, P. (1993) The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**, 609-616, doi: 10.1038/jcbfm.1993.79.
 79. Zhu, C. Z., and Auer, R. N. (1994) Intraventricular administration of insulin and IGF-1 in transient forebrain ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **14**, 237-242, doi: 10.1038/jcbfm.1994.30.
 80. Russo, V., Candeloro, P., Malara, N., Perozziello, G., Iannone, M., Scicchitano, M., Mollace, R., Musolino, V., Gliozzi, M., Carresi, C., Morittu, V. M., Gratteri, S., Palma, E., Muscoli, C., Di Fabrizio, E., and Mollace, V. (2019) Key role of cytochrome C for apoptosis detection using Raman microimaging in an animal model of brain ischemia with insulin treatment, *Appl. Spectrosc.*, **73**, 1208-1217, doi: 10.1177/0003702819858671.
 81. Sanderson, T. H., Kumar, R., Sullivan, J. M., and Krause, G. S. (2008) Insulin blocks cytochrome c release in the reperfused brain through PI3-K signaling and by promoting Bax/Bcl-XL binding, *J. Neurochem.*, **106**, 1248-1258, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05473.x.
 82. Sanderson, T. H., Kumar, R., Murariu-Dobrin, A. C., Page, A. B., Krause, G. S., and Sullivan, J. M. (2009) Insulin activates the PI3K-Akt survival pathway in vulnerable neurons following global brain ischemia, *Neurol. Res.*, **31**, 947-958, doi: 10.1179/174313209X382449.
 83. Sanderson, T. H., Mahapatra, G., Pecina, P., Ji, Q., Yu, K., Sinkler, C., Varughese, A., Kumar, R., Bukowski, M. J., Tousignant, R. N., Salomon, A. R., Lee, I., and Hüttemann, M. (2013) Cytochrome C is tyrosine 97 phosphorylated by neuroprotective insulin treatment, *PLoS One*, **8**, e78627, doi: 10.1371/journal.pone.0078627.
 84. Duarte, A. I., Santos, P., Oliveira, C. R., Santos, M. S., and Rego, A. C. (2008) Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 β signaling pathways and changes in protein expression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 994-1002, doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.02.016.
 85. Duarte, A. I., Moreira, P. I., and Oliveira, C. R. (2012) Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone, *J. Aging Res.*, **2012**, 384017, doi: 10.1155/2012/384017.
 86. Hughes, T. M., and Craft, S. (2016) The role of insulin in the vascular contributions to age-related dementia, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 983-991, doi: 10.1016/j.bbdis.2015.11.013.
 87. Muniyappa, R., and Yavuz, S. (2013) Metabolic actions of angiotensin II and insulin: a microvascular endothelial balancing act, *Mol. Cell Endocrinol.*, **378**, 59-69, doi: 10.1016/j.mce.2012.05.017.
 88. McKay, M. K., and Hester, R. L. (1996) Role of nitric oxide, adenosine, and ATP-sensitive potassium channels in insulin-induced vasodilation, *Hypertension*, **28**, 202-208, doi: 10.1161/01.hyp.28.2.202.
 89. Hung, L. M., Huang, J. P., Liao, J. M., Yang, M. H., Li, D. E., Day, Y. J., and Huang, S. S. (2014) Insulin renders diabetic rats resistant to acute ischemic stroke by arresting nitric oxide reaction with superoxide to form peroxynitrite, *J. Biomed. Sci.*, **21**, 92, doi: 10.1186/s12929-014-0092-0.
 90. Beilharz, E. J., Russo, V. C., Butler, G., Baker, N. L., Connor, B., Sirimanne, E. S., Dragunow, M., Werther, G. A., Gluckman, P. D., Williams, C. E., and Scheepens, A. (1998) Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **59**, 119-134, doi: 10.1016/s0169-328x(98)00122-3.
 91. Schober, M. E., Ke, X., Xing, B., Block, B. P., Requena, D. F., McKnight, R., and Lane, R. H. (2012) Traumatic brain injury increased IGF-1B mRNA and altered IGF-1 exon 5 and promoter region epigenetic characteristics in the rat pup hippocampus, *J. Neurotrauma*, **29**, 2075-2085, doi: 10.1089/neu.2011.2276.
 92. Åberg, D., Jood, K., Blomstrand, C., Jern, C., Nilsson, M., Isgaard, J., and Aberg, N. D. (2011) Serum IGF-I levels correlate to improvement of functional outcome after ischemic stroke, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, E1055-E1064, doi: 10.1210/jc.2010-2802.
 93. Brywe, K. G., Mallard, C., Gustavsson, M., Hedtjärn, M., Leverin, A. L., Wang, X., Blomgren, K., Isgaard, J., and Hagberg, H. (2005) IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3 β ? *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1489-1502, doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03982.x.
 94. Rizk, N. N., Rafols, J. A., and Dunbar, J. C. (2006) Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide, *Brain Res.*, **1096**, 204-212, doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.060.
 95. Lin, S., Fan, L. W., Rhodes, P. G., and Cai, Z. (2009) Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, *Exp. Neurol.*, **217**, 361-370, doi: 10.1016/j.expneurol.2009.03.021.
 96. Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., and Zhu, X. (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 9-22, doi: 10.1038/nrn2495.

97. Storm-Mathisen, J., Danbolt, N. C., Rothe, F., Torp, R., Zhang, N., Aas, J. E., Kanner, B. I., Langmoen, I., and Ottersen, O. P. (1992) Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport of glutamate in normal and ischemic brain tissue, *Prog. Brain Res.*, **94**, 225-241, doi: 10.1016/s0079-6123(08)61753-7.
98. Prabhu, D., Khan, S. M., Blackburn, K., Marshall, J. P., and Ashpole, N. M. (2019) Loss of insulin-like growth factor-1 signaling in astrocytes disrupts glutamate handling, *J. Neurochem.*, **151**, 689-702, doi: 10.1111/jnc.14879.
99. Logan, S., Pharaoh, G. A., Marlin, M. C., Masser, D. R., Matsuzaki, S., Wronowski, B., Yeganeh, A., Parks, E. E., Premkumar, P., Farley, J. A., Owen, D. B., Humphries, K. M., Kinter, M., Freeman, W. M., Szweida, L. I., Van Remmen, H., and Sonntag, W. E. (2018) Insulin-like growth factor receptor signaling regulates working memory, mitochondrial metabolism, and amyloid- β uptake in astrocytes, *Mol. Metab.*, **9**, 141-155, doi: 10.1016/j.molmet.2018.01.013.
100. Grinberg, Y. Y., Dibbern, M. E., Levasseur, V. A., and Kraig, R. P. (2013) Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF- α responses to spreading depression, *J. Neurochem.*, **126**, 662-672, doi: 10.1111/jnc.12267.
101. Lee, C. C., Huang, C. C., and Hsu, K. S. (2011) Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways, *Neuropharmacology*, **61**, 867-879, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.06.003.
102. Lioutas, V. A., Alfaro-Martinez, F., Bedoya, F., Chung, C. C., Pimentel, D. A., and Novak, V. (2015) Intranasal insulin and insulin-like growth factor 1 as neuroprotectants in acute ischemic stroke, *Transl. Stroke Res.*, **6**, 264-275, doi: 10.1007/s12975-015-0409-7.
103. Yu, L. Y., and Pei, Y. (2015) Insulin neuroprotection and the mechanisms, *Chin. Med. J. (Engl.)*, **128**, 976-981, doi: 10.4103/0366-6999.154323.
104. Lioutas, V. A., and Novak, V. (2016) Intranasal insulin neuroprotection in ischemic stroke, *Neural Regen. Res.*, **11**, 400-401, doi: 10.4103/1673-5374.179040.
105. Romanova, I. V., Derkach, K. V., Mikhрина, A. L., Sukhov, I. B., Mikhailova, E. V., and Shpakov, A. O. (2018) The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons of normal and obese rodents, *Neurochem. Res.*, **43**, 821-837, doi: 10.1007/s11064-018-2485-z.
106. Derkach, K., Zakhарova, I., Zorina, I., Bakhtuykov, A., Romanova, I., Bayunova, L., and Shpakov, A. (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect, *PLoS One*, **14**, e0213779, doi: 10.1371/journal.pone.0213779.
107. Gänger, S., and Schindowski, K. (2018) Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: a review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa, *Pharmaceutics*, **10**, 116, doi: 10.3390/pharmaceutics10030116.
108. Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S. R., Green, P. S., Leverenz, J., Cross, D., and Gerton, B. (2012) Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial, *Arch. Neurol.*, **69**, 29-38, doi: 10.1001/archneurol.2011.233.
109. Kooijman, R., Sarre, S., Michotte, Y., and De Keyser, J. (2009) Insulin-like growth factor I: a potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke? *Stroke*, **40**, e83-e88, doi: 10.1161/STROKEAHA.108.528356.
110. Fan, L. W., Carter, K., Bhatt, A., and Pang, Y. (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats, *Neural Regen. Res.*, **14**, 1046-1051, doi: 10.4103/1673-5374.250624.
111. Picone, P., Sabatino, M. A., Ditta, L. A., Amato, A., San Biagio, P. L., Mulè, F., Giacomazza, D., Dispenza, C., and Di Carlo, M. (2018) Nose-to-brain delivery of insulin enhanced by a nanogel carrier, *J. Control Release*, **270**, 23-36, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.040.
112. Lochhead, J. J., Kellohen, K. L., Ronaldson, P. T., and Davis, T. P. (2019) Distribution of insulin in trigeminal nerve and brain after intranasal administration, *Sci. Rep.*, **9**, 2621, doi: 10.1038/s41598-019-39191-5.
113. Liu, X. F., Fawcett, J. R., Thorne, R. G., DeFor, T. A., and Frey, W. H. 2nd (2001) Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage, *J. Neurol. Sci.*, **187**, 91-97, doi: 10.1016/s0022-510x(01)00532-9.
114. Liu, X. F., Fawcett, J. R., Thorne, R. G., and Frey, W. H. 2nd (2001) Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion, *Neurosci. Lett.*, **308**, 91-94, doi: 10.1016/s0304-3940(01)01982-6.
115. Fletcher, L., Kohli, S., Sprague, S. M., Scranton, R. A., Lipton, S. A., Parra, A., Jimenez, D. F., and Digicaylioglu, M. (2009) Intranasal delivery of erythropoietin plus insulin-like growth factor-I for acute neuroprotection in stroke. Laboratory investigation, *J. Neurosurg.*, **111**, 164-170, doi: 10.3171/2009.2.JNS081199.
116. Lin, S., Rhodes, P. G., and Cai, Z. (2011) Whole body hypothermia broadens the therapeutic window of intranasally administered IGF-1 in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia, *Brain Res.*, **1385**, 246-256, doi: 10.1016/j.brainres.2011.02.013.

117. Shen, H., Gu, X., Wei, Z. Z., Wu, A., Liu, X., and Wei, L. (2021) Combinatorial intranasal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-1 improves neurovascularization and functional outcomes following focal cerebral ischemia in mice, *Exp. Neurol.*, **337**, 113542, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113542.
118. Liu, X. F., Fawcett, J. R., Hanson, L. R., and Frey, W. H. 2nd (2004) The window of opportunity for treatment of focal cerebral ischemic damage with noninvasive intranasal insulin-like growth factor-I in rats, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **13**, 16-23, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2004.01.005.
119. Saber, H., Himali, J. J., Beiser, A. S., Shoamanesh, A., Pikula, A., Roubenoff, R., Romero, J. R., Kase, C. S., Vasan, R. S., and Seshadri, S. (2017) Serum insulin-like growth factor 1 and the risk of ischemic stroke: The framingham study, *Stroke*, **48**, 1760-1765, doi: 10.1161/STROKEAHA.116.016563.
120. Iravanpour, F., Dargahi, L., Rezaei, M., Haghani, M., Heidari, R., Valian, N., and Ahmadiani, A. (2021) Intranasal insulin improves mitochondrial function and attenuates motor deficits in a rat 6-OHDA model of Parkinson's disease, *CNS Neurosci. Ther.*, **27**, 308-319, doi: 10.1111/cns.13609.
121. Kim, B. H., Kelschenbach, J., Borjabad, A., Hadas, E., He, H., Potash, M. J., Nedelcovych, M. T., Rais, R., Haughey, N. J., McArthur, J. C., Slusher, B. S., and Volsky, D. J. (2019) Intranasal insulin therapy reverses hippocampal dendritic injury and cognitive impairment in a model of HIV-associated neurocognitive disorders in EcoHIV-infected mice, *AIDS*, **33**, 973-984, doi: 10.1097/QAD.0000000000002150.
122. Zhu, Y., Huang, Y., Yang, J., Tu, R., Zhang, X., He, W. W., Hou, C. Y., Wang, X. M., Yu, J. M., and Jiang, G. H. (2022) Intranasal insulin ameliorates neurological impairment after intracerebral hemorrhage in mice, *Neural Regen. Res.*, **17**, 210-216, doi: 10.4103/1673-5374.314320.
123. Zorina, I. I., Saveleva, L. O., Bakhtyukov, A. A., and Shpakov, A. O. (2018) Intranasal insulin administration normalizes the gene expression of antioxidant enzymes in the two-vessel ischemia and reperfusion in the rat brain, in BIOMEMBRANES 2018: International Conference 1-5 October 2018 Book of Abstracts, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50**, 467-603, doi: 10.1007/s10863-018-9775-7.
124. Zorina, I. I., Zakharova, I. O., Bayunova, L. V., and Avrova, N. F. (2018) Insulin administration prevents accumulation of conjugated dienes and trienes and inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat cerebral cortex during two-vessel forebrain ischemia and reperfusion, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **54**, 246-249, doi: 10.1134/S0022093018030109.
125. Zorina, I. I., Galkina, O. V., Bayunova, L. V., and Zakharova, I. O. (2019) Effect of insulin on lipid peroxidation and glutathione levels in a two-vessel occlusion model of rat forebrain ischemia followed by reperfusion, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **55**, 333-335, doi: 10.1134/S0022093019040094.
126. Zakharova, I. O., Bayunova, L. V., Zorina, I. I., Sokolova, T. V., Shpakov, A. O., and Avrova, N. F. (2021) Insulin and α -tocopherol enhance the protective effect of each other on brain cortical neurons under oxidative stress conditions and in rat two-vessel forebrain ischemia/reperfusion injury, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11768, doi: 10.3390/ijms22211768.
127. Zakharova, I. O., Bayunova, L. V., Zorina, I. I., Shpakov, A. O., and Avrova, N. F. (2022) Insulin and brain gangliosides prevent metabolic disorders caused by activation of free radical reactions after two-vessel ischemia-reperfusion injury to the rat forebrain, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **58**, 279-291, doi: 10.1134/S0022093022010240.
128. Duarte, A. I., Santos, M. S., Oliveira, C. R., and Rego, A. C. (2005) Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons – involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 876-889, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.002.
129. Derkach, K. V., Bogush, I. V., Berstein, L. M., and Shpakov, A. O. (2015) The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats, *Horm. Metab. Res.*, **47**, 916-924, doi: 10.1055/s-0035-1547236.
130. Derkach, K. V., Bondareva, V. M., and Shpakov, A. O. (2019) Regulatory effects of intranasal C-peptide and insulin on thyroid and androgenic status of male rats with moderate type 1 diabetes mellitus, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **55**, 493-496, doi: 10.1134/S0022093019060073.
131. Sukhov, I. B., Derkach, K. V., Chistyakova, O. V., Bondareva, V. M., and Shpakov, A. O. (2016) Functional state of hypothalamic signaling systems in rats with type 2 diabetes mellitus treated with intranasal insulin, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **52**, 204-216, doi: 10.1134/S0022093016030030.
132. Derkach, K. V., Ivantsov, A. O., Chistyakova, O. V., Sukhov, I. B., Buzanakov, D. M., Kulikova, A. A., and Shpakov, A. O. (2017) Intranasal insulin restores metabolic parameters and insulin sensitivity in rats with metabolic syndrome, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163**, 184-189, doi: 10.1007/s10517-017-3762-6.
133. Albers, G. W., Goldstein, L. B., Hess, D. C., Wechsler, L. R., Furie, K. L., Gorelick, P. B., Hurn, P., Liebeskind, D. S., Nogueira, R. G., and Saver, J. L. (2011) STAIR VII Consortium. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies, *Stroke*, **42**, 2645-2650, doi: 10.1161/STROKEAHA.111.618850.

PROSPECTS FOR THE USE OF INTRANASALLY ADMINISTERED INSULIN AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 IN CEREBRAL ISCHEMIA

Review

I. I. Zorina*, N. F. Avrova, I. O. Zakharova, and A. O. Shpakov

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
194223 Saint-Petersburg, Russia; e-mail: zorina.inna.spb@gmail.com*

Currently, the approaches used to treat stroke have significant limitations, and neuroprotective therapy is ineffective. In this regard, the search for effective neuroprotectors and the development of new neuroprotective strategies in cerebral ischemia are still relevant. Insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) play a key role in the functioning of the brain, are involved in the regulation of growth, differentiation and survival of neurons, neuronal plasticity, food intake, control peripheral metabolism and endocrine functions. They have a complex effect on the brain, including neuroprotective effects in cerebral ischemia and stroke. Experiments on animals and cell cultures have shown that insulin and IGF-1 under hypoxic conditions improve energy metabolism in neurons and glial cells, have a positive effect on blood microcirculation in the brain, restore nerve cell functions and neurotransmission processes, and have anti-inflammatory and antiapoptotic effects on brain cells. Of greatest interest to the clinic is the intranasal route of administration of insulin and IGF-1, since it allows dosed delivery of these hormones directly to the brain, bypassing the blood-brain barrier. Intranasally administered insulin demonstrates a pronounced positive effect in the correction of cognitive impairment in elderly people with neurodegenerative and metabolic disorders. Insulin and IGF-1 administered intranasally improve increase the survival of animals with ischemic stroke. The review discusses literature data and the results of our own studies on the mechanisms of the neuroprotective action of intranasally administered insulin and IGF-1 in cerebral ischemia and the prospects for their use to normalize CNS functions and reduce neurodegenerative changes in this pathology.

Keywords: intranasal insulin, insulin-like growth factor-1, cerebral ischemia, reperfusion, neuroprotective effect, oxidative stress

СВОЙСТВА ПРЕСИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ АКТИНА

© 2023 И.В. Кудряшова

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: iv_kudryashova@mail.ru*

Поступила в редакцию 03.10.2022

После доработки 12.12.2022

Принята к публикации 13.12.2022

На переживающих срезах гиппокампа крыс методом парной стимуляции исследовали изменение свойств пресинаптической кратковременной пластичности на фоне блокады деполимеризации и активации полимеризации актина. Тестирование синаптической передачи CA3-CA1 в режиме парной стимуляции с межстимульным интервалом 70 мс производилось до и на фоне джасплакинолида, ингибитора деполимеризации, применяемого также для индукции полимеризации актина. Увеличение амплитуды ответа при аппликации джасплакинолида сопровождалось снижением фасилитации при парной стимуляции (PPF), что свидетельствует о пресинаптических механизмах потенциации. Эффект усиливался пропорционально величине исходной PPF. Учитывая известные механизмы, лежащие в основе PPF, можно предположить, что при низкой вероятности выброса медиатора дополнительная полимеризация актиновых филаментов способствует её увеличению. Иначе изменялись менее типичные для поля CA1 реакции на парную стимуляцию (PPF около 1 или даже парная депрессия), и джасплакинолид увеличивал амплитуду второго, но не первого в паре ответа, так что соотношение амплитуд второго и первого ответа даже увеличивалось в среднем с 0,8 до 1. Предполагается, что, помимо основного эффекта, на фоне джасплакинолида снижается влияние факторов, способствующих парной депрессии. Так или иначе, полимеризация актина приводит к потенциации синаптических реакций, хотя паттерн активации может различаться в зависимости от исходных свойств пресинаптической пластичности. В заключение: комплексный эффект джасплакинолида, помимо увеличения вероятности выброса медиатора, включает и другие зависящие от полимеризации актина механизмы, в том числе лежащие в основе кратковременной синаптической депрессии при парной стимуляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гиппокамп, пресинаптическая пластичность, кратковременная фасилитация при парной стимуляции, кратковременная депрессия при парной стимуляции, полимеризация актина, джасплакинолид.

DOI: 10.31857/S0320972523030089, EDN: QWVKJP

ВВЕДЕНИЕ

Структура синапса поддерживается высокодинамичным «молекулярным ансамблем», включающим скелетные, каркасные (scaffold) и якорные белки, которые являются основой для встраивания и поддержания сигнальных и регуляторных белков, определяющих эффективность синапса и в том числе секрецию медиатора [1]. Простое увеличение эффективности проведения, которое, согласно концептуальным представлениям, может быть основой обучения и памяти, является лишь начальным этапом долговременных модифи-

кций, и для эффективной консолидации необходима реорганизация и обновление синаптических структур или даже синапсов [2, 3].

Молекулярной основой структурной пластичности синапсов является реорганизация актинового цитоскелета [4–6]. В частности, зависящие от актина модификации обнаружены при исследовании долговременной синаптической потенциации (LTP), в том числе и в CA1 [7]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что полимеризация актина после высокочастотного

Принятые сокращения: LTP – долговременная потенция; PPD – кратковременная депрессия при парной стимуляции; PPF – кратковременная фасилитация при парной стимуляции; PPR – соотношение амплитуд второго и первого ответа.

раздражения значительно улучшает эффективность поддержания LTP [7–11]. Большинство этих работ сообщают о полимеризации актина постсинаптического компартмента, тогда как потенциальный вклад пресинаптического компартмента никак не обсуждается. Между тем об участии актина в пресинаптических модификациях свидетельствуют эксперименты на беспозвоночных животных [12, 13]. Учитывая достаточно обоснованные представления об эволюционно консервативных механизмах регуляции, аналогичные зависимые от актина перестройки могут быть обнаружены и в синапсах позвоночных животных, включая пресинаптические модификации [1, 5, 14, 15, 16].

Наряду с постсинаптическими механизмами LTP, высокочастотное раздражение синаптических входов может приводить к увеличению пресинаптического высвобождения медиатора [17–20]. Известно, что LTP синапсов CA3-CA1 в равной степени зависит от постсинаптических и пресинаптических модификаций [21–24]. Конкретные механизмы неизвестны, однако очевидно, что реорганизация синаптических контактов подразумевает скоординированность структурных модификаций пресинаптического и постсинаптического компартмента [3]. Ранее было обнаружено, что поддержание LTP улучшается при условии посттетанического снижения PPF [25], что, как известно, считается признаком увеличения вероятности выброса медиатора [26, 27]. Вполне вероятно, что полимеризация пресинаптического актина, так же как и в постсинапсе, может иметь отношение к процессам консолидации.

Роль реполимеризации актина в регуляции пресинаптических функций достаточно хорошо изучена в экспериментах на культуре нервных клеток, включая исследования синапсов гиппокампа [14, 15, 28, 29]. Однако использование ингибиторов полимеризации и деполимеризации в электрофизиологических экспериментах на срезах и *in vivo* не всегда приводит к однозначным результатам, и наблюдаемые при этом пресинаптические модификации зачастую не соответствуют теоретическим ожиданиям. Это означает, что в эффекты ингибиторов вмешивается множество дополнительных факторов, каждый из которых необходимо контролировать в отдельности. Предполагается, что одним из существенных факторов разнообразия эффектов может быть исходное состояние синапса.

Для данного корреляционного исследования в качестве контролируемого фактора был выбран показатель, позволяющий оценить вклад пресинаптического компонента в

изменения амплитуды синаптических потенциалов на фоне джасплакинолида. Согласно гипотезе остаточного кальция, феномен PPF имеет преимущественно пресинаптическую природу, и этот тест часто используется для определения изменения вероятности выброса медиатора [27, 30, 31]. Чтобы оценить, может ли полимеризация актина приводить к пресинаптическим модификациям в синапсах гиппокампа, на переживающих срезах гиппокампа крыс сравнивали соотношение амплитуд CA3-CA1 второй и первой реакций на парную стимуляцию (PPR) до и на фоне инкубации с джасплакинолидом, применяемым *in vitro* для индукции полимеризации актина [32]. Чтобы минимизировать вклад других пресинаптических и постсинаптических механизмов, включая суммацию с бисинаптическим тормозным постсинаптическим потенциалом (ТПСП), которые, наряду с зависимой от остаточного кальция пресинаптической фасилитацией моносинаптических возбуждающих входов, способны изменять реакцию на парную стимуляцию регистрируемых в поле CA1 экстраклеточных потенциалов, парная стимуляция производилась с межстимульным интервалом 70 мс. В данной работе представлен детальный корреляционный анализ эффектов джасплакинолида с учётом всех характеристик, включая особенности изменения амплитуды первого и второго в паре ответа, их соотношения и их исходно разную величину.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Крысы Wistar были получены из питомника «Столбовая» РАМН (Московская обл.) и содержались в институтском виварии по 4–5 животных в каждой клетке. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде, световая фаза суточного цикла продолжалась с 8:00 до 20:00. В работе использовали 14 животных 1–1,5-месячного возраста весом 100–150 г.

Процедура изготовления срезов. После быстрой декапитации черепную кость подрезали с затылочной стороны и отгибали в сторону. Острым лезвием кору надрезали по направлению от глаза к середине мозжечка. С помощью ручного слайсера извлекали несколько срезов перпендикулярно продольной оси гиппокампа. Вся процедура от начала декапитации до помещения срезов в перфузионную среду занимала не более 1,5–2 минут. Состав перфузионной среды (мМ): NaCl – 124; KCl – 5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1,3; $CaCl_2$ – 2,5; NaH_2PO_4 – 1;

NaHCO_3 — 26; D-глюкоза — 10; карбоген — 95% O_2 и 5% CO_2 ; pH 7,3–7,4, температура 32 °C. В каждом эксперименте было использовано 3–4 среза. Для стабилизации срезы одновременно инкубировали в экспериментальной камере в течение 1,5 часов без предъявления тестирующих раздражений.

Стимуляция и регистрация. Для регистрации фокальных потенциалов в пирамидном слое поля CA1 использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные 0,33 М раствором хлористого натрия. Раздражающие биполярные электроды устанавливали в радиальном слое на коллатерали Шаффера. Тестирование фокальных потенциалов в течение всего времени регистрации производилось парными стимулами с межстимульным интервалом 70 мс. Чтобы увеличить разнообразие исходных PPF в срезах гиппокампа одного и того же животного, использовалась переменная интенсивность раздражения с поочерёдным тестированием реакций с амплитудой 50%, а также 30% и/или 70% от максимальной величины.

Используемые препараты. После стабилизации и контрольного тестирования повторное тестирование в каждом из срезов производилось на фоне аппликации джасплакинолида — проникающего через мембрану пептида, стабилизирующего актиновые филаменты («Sigma», США, Cat# J4580). Аликвоты исходного раствора замораживали при –20 °C и непосредственно перед употреблением растворяли в стандартном перфузионном растворе до конечной концентрации 0,2 мкМ. Не прекращая тестирования, этот раствор постепенно подвели к одному из срезов непосредственно в область регистрации в течение 20 мин с помощью программируемого микроинъектора без отключения основного протока. Такой способ подведения позволяет минимизировать эффект смены протока. Каждый следующий срез инкубировали индивидуально. Порядок тестирования зависел от расположения среза в экспериментальной камере, начиная с наиболее удалённого по ходу основного протока.

Статистический анализ. Измеряли амплитуду популяционного спайка первого в паре ответа (A_1) и усредняли по всем срезам в соответствии с моментом от начала аппликации. Результаты выражены в виде $M \pm \text{SEM}$. Дополнительно измеряли амплитуду второго в паре ответа (A_2) и вычисляли соотношение амплитуд второго и первого в паре ответа A_2/A_1 (PPR). Для определения статистической значимости влияния джасплакинолида был использован t -критерий Стьюдента для зависимых переменных. В подгруппах данных,

включающих реакции с исходно низкими или высокими значениями PPR, после разделения выборки утративших соответствие нормальному распределению, использовали критерий Вилкоксона для связанных пар наблюдений. Связь всех исследуемых показателей с их изменением на фоне джасплакинолида (ΔA_1 , ΔA_2 , ΔPPR) определяли с помощью вычисления коэффициентов корреляции Пирсона. Статистическая обработка данных производилась с помощью программного обеспечения STATISTICA12 («StatSoft», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При сравнении средних величин по всей выборке в целом было обнаружено, что амплитуда первого в паре ответа на фоне джасплакинолида постепенно увеличивалась. Судя по изменению средних амплитуд, через 20 мин после начала подведения, например, тех, которые составляют половину от максимальной величины (рис. 1, а, $n = 14$, $1,39 \pm 0,1$ мВ до и $1,76 \pm 0,16$ мВ после начала подведения, $t = 2,33$, $p = 0,03$ для зависимых выборок; для сравнения: $1,27 \pm 0,15$ мВ до и $1,32 \pm 0,29$ мВ после подведения ДМСО, $n = 11$, $t = 0,27$, $p = 0,79$ для зависимых выборок), чаще преобладала потенциация, хотя результаты индивидуальных тестов сильно различались. Поэтому основная часть исследования была направлена на поиск факторов, определяющих индивидуальную вариабельность реакций на подведение джасплакинолида. Сравнение зависимости амплитуды ответа от входных характеристик до и на фоне джасплакинолида не выявило значимого влияния фактора интенсивности тестирующего раздражения на характер модификаций. Следовательно, разнообразие и нестабильность эффектов джасплакинолида определяется другими факторами. В частности, оказалось, что даже в одном и том же гиппокампе эффект потенциации больше зависел от особенностей исходных реакций на парную стимуляцию.

Поскольку потенциация на фоне джасплакинолида сопровождалась снижением PPF, далее представлен более детальный анализ этих результатов. Учитывая возможность интерференции пресинаптической потенциации с другими зависимыми от актина механизмами, необходимо было контролировать любую несогласованность изменения амплитуды первого и второго ответа и их соотношения. Корреляционный анализ показал, что главным фактором, определяющим различия в эффектах джасплакинолида, является величина исходной PPR.

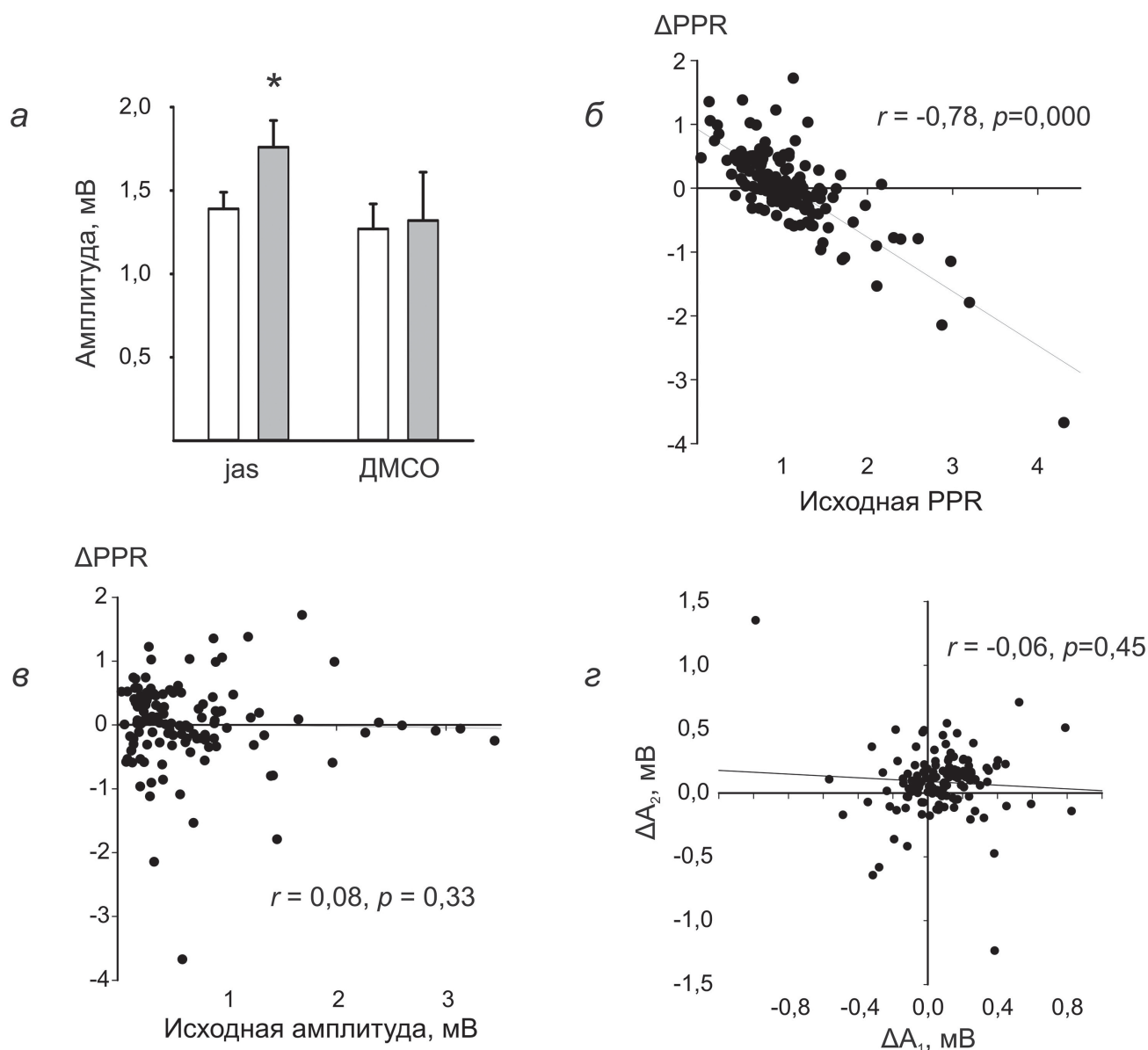


Рис. 1. Закономерности изменения величины PPR при аппликации джасплакинолида. *а:* Потенциация первого в паре ответа ($n = 14$). Ордината — амплитуда первого в паре ответа при средней интенсивности раздражения (половина от максимальной до подведения джасплакинолида). В качестве контроля представлены результаты аппликации ДМСО. Светлые столбики — до, тёмные столбики — через 20 мин после начала подведения. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$. Отмечены значимые (* $p < 0,05$) отклонения относительно среднего контрольного уровня. *б, в:* Изменения PPR (ордината: $\Delta PPR = PPR_{дж} - PPR_{до}$) в зависимости от исходных параметров (абсцисса, *б:* исходные PPR, *в:* амплитуда первого в паре ответа до аппликации). *г:* Разница между величиной амплитуд до и после аппликации. Первая (абсцисса, $\Delta A_1 = A1_{дж} - A1_{до}$) и вторая (ордината, $\Delta A_2 = A2_{дж} - A2_{до}$) амплитуды меняются независимо

Точечная диаграмма на рис. 1, *б* иллюстрирует достаточно чёткую зависимость изменения PPR от величины PPR до аппликации. По всей выборке в целом коэффициент корреляции между исходной PPR и величиной её снижения составил $r = -0,78$, $p = 0,000$, $n = 139$. Очевидно, что чем больше исходная вероятность выброса медиатора приближается к максимальной, тем меньше возможность пресинаптической потенциации и, соответственно, снижения PPF. При этом изменения

PPR не зависели от исходной амплитуды ответа ($r = 0,08$, $p = 0,33$, $n = 139$, рис. 1, *в*). Следовательно, сам по себе уровень активации, в частности, создаваемый балансом возбуждения и торможения, вряд ли имеет отношение к разнообразию эффектов, и дефицит пресинаптической потенциации синапсов с исходно высокой вероятностью выброса медиатора может быть единственным объяснением обнаруженной в эксперименте корреляционной зависимости.

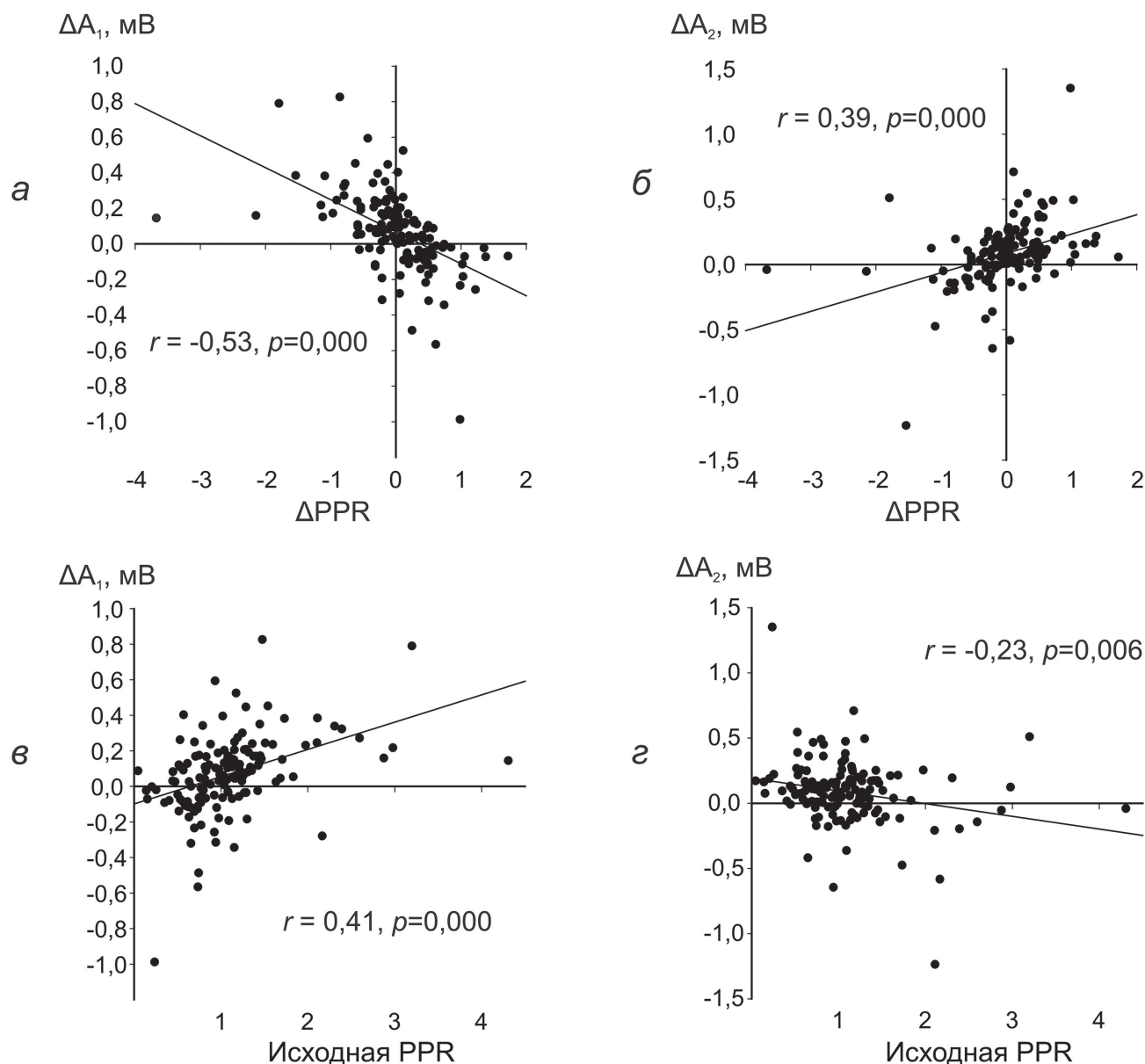


Рис. 2. Изменения первого и второго в паре ответа и их обратная связь с другими характеристиками. Абсцисса — изменения PPR ($PPR_{дж} - PPR_{до}$, а и б) и исходные PPR (в и г). Ордината — изменения первой (а и в, $\Delta A_1 = A1_{дж} - A1_{до}$) и второй (б и г, $\Delta A_2 = A2_{дж} - A2_{до}$) амплитуды в ответ на аппликацию джасплакинолида

Необходимо отметить, что определение вероятности выброса медиатора с помощью PPF-теста существенно усложняется в некоторых экспериментах из-за увеличения амплитуды второго в паре ответа. Действительно, небольшая, но значимая корреляция между изменением амплитуды второго ответа и PPR подтверждается статистически ($r = 0,38$, $p = 0,000$, $n = 139$). Существенно, что при парной стимуляции первый и второй потенциалы по-разному реагировали на подведение джасплакинолида ($r = -0,06$, $p = 0,45$, $n = 139$, рис. 1, з). Снижение величины PPF сопровождалось увеличением амплитуды первого в паре отве-

та ($r = -0,53$, $p = 0,000$, $n = 139$, рис. 2, а), что свидетельствует в пользу увеличения вероятности выброса медиатора. Однако потенциация второго в паре ответа сопровождалась увеличением PPR ($r = 0,39$, $p = 0,000$, $n = 139$, рис. 2, б). Если сравнивать с модификациями амплитуды первого ответа, соответствующие коэффициенты корреляции достоверно различались ($p < 0,001$) и были противоположны по знаку (рис. 2, а, б). Так или иначе, полимеризация актина в основном приводит к потенциации синаптических реакций, но паттерн активации может меняться в зависимости от исходной величины PPR. На рис. 2, в видно,

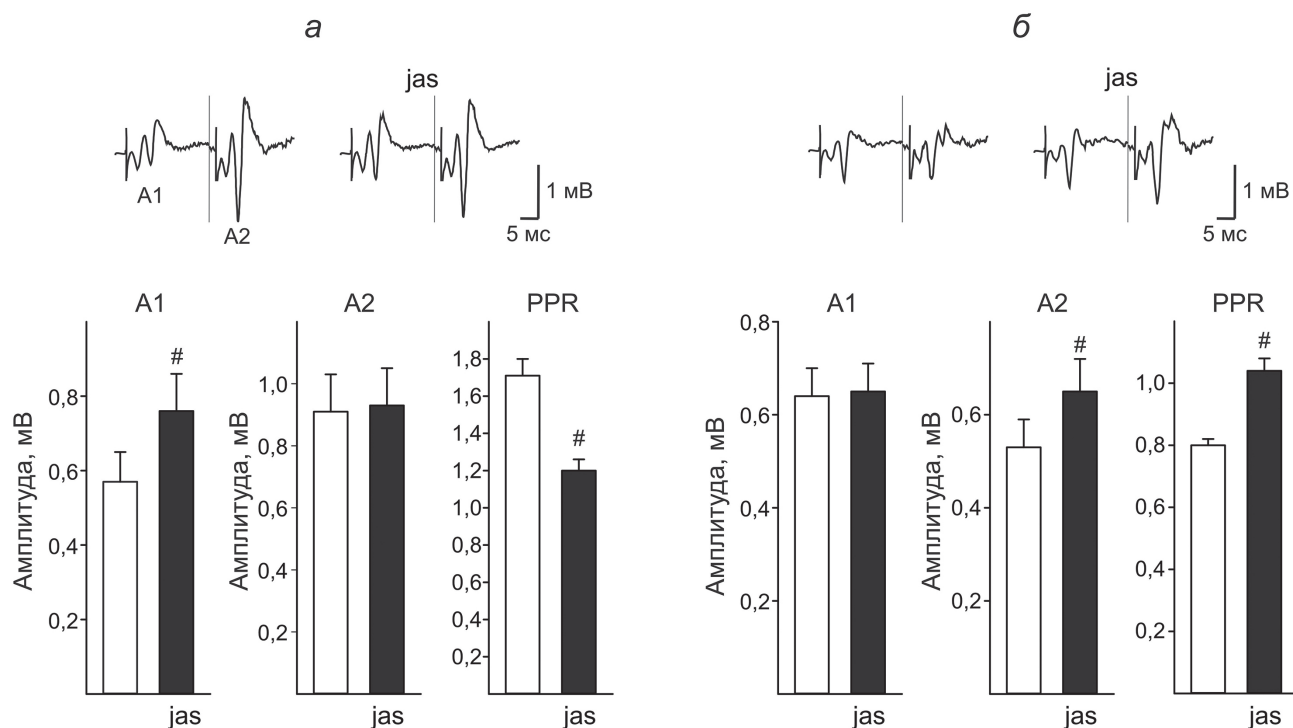


Рис. 3. Особенности влияния джасплакинолида на реакции с исходно высокими (*a*, $n = 45$) и низкими (*б*, $n = 94$) показателями PPR. Ордината – амплитуда первого (A1), второго (A2) в паре ответа и их соотношение (PPR). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$. Светлые и тёмные столбики – амплитуда до и после аппликации джасплакинолида соответственно. Звёздочкой отмечена статистическая значимость каждого из эффектов джасплакинолида (тест Вилкоксона, *a* – подгруппа с исходно высокими значениями: A1 – $p < 0,007$, A2 – $p = 0,13$, PPR – $p < 0,000007$; *б* – подгруппа с исходно низкими значениями PPR: A1 – $p = 0,07$, A2 – $p < 0,0007$, PPR – $p < 0,007$). Примеры экспериментальных записей иллюстрируют типичные для соответствующей подгруппы реакции на парную стимуляцию с межстимульным интервалом 70 мс до и после аппликации джасплакинолида. Для удобства восприятия часть записи между первым и вторым предъявлением удалялась программой непосредственно при регистрации. Момент включения второго экрана отмечен вертикальной линией

что рост амплитуды первого в паре ответа на фоне джасплакинолида усиливался пропорционально величине исходной PPR ($r = 0,41$, $p = 0,000$, $n = 139$, рис. 2, *в*). Значимая корреляция является ещё одним аргументом в пользу того, что суммарная потенция снижается за счёт дефицита пресинаптической потенциации синапсов с исходно высокой вероятностью выброса медиатора. Вместе с тем различия в исходной вероятности выброса медиатора не могут объяснить всех эффектов джасплакинолида и, в частности, увеличения амплитуды второго в паре ответа. В отличие от позитивной корреляции, обнаруженной для потенциации первого ответа ($r = 0,41$, $p = 0,000$, $n = 139$, рис. 2, *в*), обращает на себя внимание обратная зависимость прироста амплитуды второго в паре ответа от исходной величины PPR ($r = -0,23$, $p = 0,006$, $n = 139$, рис. 2, *з*). Таким образом, в основе потенциации первого и второго ответа, скорее всего, лежат разные механизмы, и их преобладание зависит от исходных условий аппликации джасплакинолида.

Результаты корреляционного анализа показывают, что по результатам всей выборки в целом сравнение средних величин до и после аппликации джасплакинолида может приводить к неправильным выводам из-за неоднородности исходных условий его применения. На этом основании при статистическом анализе в данной работе было необходимо использовать исходную величину PPR в качестве одного из группирующих факторов. Критерием для разделения выборки служила величина исходной PPR = 1,2. В соответствии с этим критерием данные были сгруппированы в две отдельные выборки в зависимости от исходной величины PPR. Более типичной для CA3-CA1-синапсов реакцией на парную стимуляцию является, как правило, достаточно хорошо выраженная PPF. Примеры таких реакций на парную стимуляцию с межстимульным интервалом 70 мс до и на фоне джасплакинолида представлены на рис. 3, *а*. В ответ на аппликацию джасплакинолида такие реакции демонстрировали увеличение амплитуды первого в паре ответа с высокой степенью достовер-

ности (в среднем по подгруппе с $0,57 \pm 0,08$ мВ до $0,76 \pm 0,1$ мВ, $t = 6,14$, $p = 0,0000$ для зависимых выборок при сравнении амплитуд до и после аппликации). Амплитуда второго в паре ответа при этом оставалась неизменной (в среднем по подгруппе $0,91 \pm 0,12$ мВ до и $0,93 \pm 0,12$ мВ после аппликации, $t = 0,33$, $p = 0,74$ для зависимых выборок). В соответствии с этим происходило значимое снижение PPF (в среднем по подгруппе с $1,71 \pm 0,09$ до $1,2 \pm 0,06$, $t = 4,54$, $p = 0,00004$ для зависимых выборок), что свидетельствует в пользу участия полимеризации актина в регуляции вероятности выброса медиатора в типичных для поля CA1 условиях. Такого же снижения PPF не наблюдалось после инкубации с ДМСО ($1,77 \pm 0,23$ до и $2,36 \pm 0,59$ после подведения, $n = 11$, $t = 1,6$, $p = 0,13$ для зависимых выборок), хотя все срезы относились к подгруппе с исходно высокими значениями PPF.

Менее типичным для поля CA1 является отсутствие PPF или даже кратковременная депрессия (PPD). Примеры таких реакций представлены на рис. 3, б. В этих условиях джасплакинолид не оказывал заметного влияния на амплитуду первого в паре ответа (в среднем $0,64 \pm 0,06$ мВ до и $0,65 \pm 0,06$ мВ после аппликации, $t = 0,6$, $p = 0,55$ для зависимых выборок). При этом амплитуда второго ответа неожиданно увеличивалась в среднем с $0,53 \pm 0,06$ мВ до $0,65 \pm 0,07$ мВ ($t = 4,94$, $p = 0,000003$), так что соотношение амплитуд второго и первого ответа даже увеличивалось в среднем с $0,8 \pm 0,02$ до $1,04 \pm 0,04$ ($t = 5,34$, $p = 0,000001$ для зависимых выборок). Неизменность амплитуды первого ответа свидетельствует о том, что рост PPR не может быть связан со снижением вероятности выброса медиатора. Из этого следует, что на фоне джасплакинолида существенно снижается влияние факторов, способствующих парной депрессии. В целом, этот эффект тем меньше, чем больше исходная PPR. Слабая, хотя и значимая корреляция ($r = -0,23$, $p = 0,006$) демонстрирует, что, с одной стороны, влияние джасплакинолида на механизмы PPD может быть ограничено из-за отсутствия тормозного компонента ещё до аппликации, а с другой стороны, чёткая зависимость нарушается сопутствующими факторами, главным из которых, по-видимому, является изменение вероятности выброса медиатора. Действительно, после разделения всей выборки на подгруппы с разной величиной PPR и использования их в качестве одного из группирующих факторов статистический анализ (ANOVA для повторных измерений) подтвердил не только активирующее

влияние джасплакинолида на амплитуду первого ($F(1,137) = 27,25$, $p = 0,000001$) и второго ответа ($F(1,137) = 8,71$, $p = 0,003$) и снижение PPR ($F(1,137) = 7,04$, $p = 0,0008$) по всей выборке в целом, но и зависимость эффектов джасплакинолида от исходной величины PPR (взаимодействие факторов $F(1,137) = 20,40$, $p = 0,00001$, $F(1,137) = 5,52$, $p = 0,02$ и $F(1,137) = 54,88$, $p = 0,000000$ при оценке изменения A_1 , A_2 и PPR соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что полимеризация актина сама по себе может стимулировать развитие синаптических модификаций в срезах гиппокампа относительно взрослых крыс. В отличие от предполагаемых механизмов, объясняющих способность джасплакинолида предотвращать депотенциацию LTP в гиппокампе взрослых крыс [7, 11], простое тестирование вряд ли может вызывать структурные изменения. Не исключено, что в основе наблюдаемых на фоне джасплакинолида изменений лежит гомеостатическая регуляция синаптических функций, которая обеспечивает восстановление оптимального уровня нейронной активности [33–36]. Такая возможность частично подтверждается при использовании дестабилизирующих актин препаратов [14, 28]. Примечательно, что и полимеризация, и деполимеризация не влекут за собой однозначных модификаций определённого типа [14, 29, 37, 38]. В частности, полимеризация актина на фоне джасплакинолида может усиливать или ослаблять синаптическую активность [7, 28, 38, 39]. Может быть, поэтому изменения не всегда выявляются при регистрации суммарной активности [8, 14, 40] из-за одновременной потенциации и депрессии в разных синапсах регистрируемой популяции нейронов [36, 41]. Соответственно, сравнение средних амплитуд до и после аппликации джасплакинолида, как показывают наши эксперименты, может быть малоэффективным в зависимости от преобладания того или иного эффекта. Корреляционный анализ в наших экспериментах демонстрирует, что вызываемая джасплакинолидом потенциация происходит преимущественно при условии исходно высокой PPF и, следовательно, низкой вероятности выброса медиатора. Вполне допустимо предположить, что реполимеризация актина лишь создаёт предпосылки для начала модификаций, и их характер соответствует «молекулярному профилю» синапса [29, 33].

В наших экспериментах потенциация низкоэффективных синапсов после аппликации джасплакинолида сопровождалась снижением величины PPF. В другой работе этот эффект также не был обнаружен при сравнении средних PPF, однако авторы не учитывали индивидуальную вариабельность реакций на подведение джасплакинолида [7]. Наши данные свидетельствуют о том, что изменения PPR могут иметь противоположную направленность в зависимости от исходной величины, и поэтому в среднем полученные эффекты могут колебаться, если выборка имеет разный состав, в частности, по исходной величине PPR. К тому же в большинстве экспериментальных исследований, в отличие от нашей работы, чаще всего отбирают для регистрации наиболее стандартные срезы. Различия в эффектах могут быть в какой-то степени связаны с используемым в нашей работе более щадящим изготовлением срезов.

Тот факт, что потенциация на фоне джасплакинолида сопровождается снижением PPF, согласуется с представлениями об участии полимеризации актина в регуляции вероятности выброса медиатора. Зависимость пресинаптической пластичности от полимеризации и деполимеризации актина обнаружена в исследованиях на нервной системе беспозвоночных животных [12, 38, 42] и развивающихся синапсах позвоночных животных, особенно в культуре нейронов гиппокампа [14, 15, 28, 29, 43]. В зрелых нейронах гиппокампа очевидного влияния полимеризации актина на пресинаптические функции пока не обнаружено [15, 28, 43]. Тем не менее невозможно полностью исключить, что зависимые от полимеризации актина модификации могут происходить локально при реорганизации отдельных синапсов, например, при долговременной пластичности. Очевидно, что активация полимеризации может быть менее заметна на фоне высокого содержания базового F-актина [15, 28], тем более что пресинаптический компартмент центральной нервной системы позвоночных животных в силу некоторых методических ограничений менее доступен для исследования.

В свете представлений об эволюционной консервативности организации секреторного аппарата [34, 35, 44], данные о пресинаптических функциях актина в нервной системе позвоночных животных, включая центральные синапсы, скорее всего, не отличаются от тех, которые получены более доступными методами [5, 13, 14, 34, 45–47]. Образованные F-актином пресинаптические филаменты

отвечают за транспорт и заякоривание везикул и секреторных белков, выступают в качестве барьера [5, 13, 15, 38, 43, 48, 49]. К сожалению, мало известно об участии актина в регуляции секреции медиатора в зрелых синапсах позвоночных животных [14–16]. Необходимость реполимеризации актина для рециркуляции и активного транспорта везикул и секреторных белков в активную зону пресинапса предполагает, что реорганизация актинового цитоскелета может влиять на пресинаптическую пластичность [13, 29, 34] и вероятность выброса медиатора [13, 28].

Дестабилизация синапсов способствует консолидации долговременных перестроек [3], но реполимеризация актина сама по себе не гарантирует специфичности модификаций [14, 16, 38]. По сути такие же, как в нашей работе, результаты, в частности, снижение PPR, были представлены в исследованиях на культуре нейронов гиппокампа, но при деполимеризации актина в ответ на подведение латрукулина А [14]. Джасплакинолид и другие активаторы полимеризации актина, включая естественные, демонстрируют большое разнообразие эффектов [7, 29, 37]. Учитывая данные других авторов [13, 35, 36], снижение PPF после подведения джасплакинолида можно объяснить стабилизацией F-актина, образованного вследствие гомеостатической потенциации низкоэффективных реакций. У позвоночных животных такой механизм явно имеет отношение к пластичности шипиков, что послужило развитию представлений о роли полимеризации актина в стабилизации первоначально лабильного состояния потенцированных синапсов [7].

Вероятность выброса медиатора определяется композиционным составом активной зоны [13, 33, 47, 50–54] с непосредственным участием тесно взаимодействующих с актином белков [29, 45, 51, 52]. В активной зоне присутствуют в том числе стимулирующие полимеризацию белки [14, 42, 47, 51, 55–57], что обеспечивает локальные перестройки по ходу активации [5, 13, 36, 38, 58–61]. Джасплакинолид способствует образованию актиновых филаментов [62, 63], причём пресинаптические терминали в культуре нейронов гиппокампа демонстрируют прирост даже в отсутствие какой-либо дополнительной активации [15], что может влиять на изменение вероятности выброса медиатора при парной стимуляции [5, 13, 29, 38].

Необходимо отметить, что выявление модификаций, непосредственно связанных с изменением вероятности выброса медиатора, осложняется суммацией с бисинаптическим ТПСР.

Представленные в работе данные трудно интерпретировать без привлечения гипотезы об увеличении вероятности выброса медиатора. Потенциальная возможность влияния на пресинаптическую пластичность подтверждается литературными данными [64]. Вместе с тем влияние тормозного компонента, как правило, усиливается при увеличении интенсивности тестирующего раздражения и, соответственно, амплитуды ответа, и влияние этих факторов, несомненно, выявлялось бы корреляционным анализом, чего не наблюдается в эксперименте: изменения PPF зависели от их исходной величины, но не от исходной амплитуды или интенсивности раздражения. Безусловно, эффекты джасплакинолида не ограничиваются избирательным влиянием исключительно на возбуждающую или тормозную передачу. Более подробный анализ изменений ТПСП представлен в другой работе [65].

В рамках этих представлений определённые затруднения вызывает интерпретация модификаций второго в паре ответа. Маловероятно, что даже при исходно высокой вероятности секреции фасилитация при парной стимуляции может быть ограничена по причине истощения запасов медиатора [51, 66–68]. Необходимо, однако, отметить, что зависимость от актина пополнение запасов медиатора [5, 12, 14, 16, 29, 46, 49, 57, 69–72] вполне подходит для объяснения эффектов джасплакинолида, связанных с увеличением второго в паре ответа, тем более что полимеризация актина имеет отношение к механизмам мобилизации доступных для высвобождения синаптических везикул активной зоны пресинапса [29, 46, 51, 58, 60, 72]. Взаимодействие актиновых филаментов с пресинаптическими везикулами опосредовано синапсином [42, 70, 74]. Принудительная полимеризация актина и, как следствие, изменение опосредованных синапсином функций рециркуляции синаптических везикул [55, 56] может влиять на свойства кратковременной пластичности, в том числе при парной стимуляции [51, 75–77]. Известны также и некоторые другие интерферирующие с PPF механизмы, обеспечивающие дополнительный прирост [53, 54, 78] или подавление [54, 79–81] следующего постсинаптического потенциала, но их связь с полимеризацией актина пока не обнаружена. Неясно также, по какой причине упомянутые выше зависимые от актина механизмы активации PPF [14, 37, 53, 82–84] могли бы реагировать на подведение джасплакинолида только при условии более очевидной депрессии второго в паре ответа. При постсинаптической потенциации увеличивались бы оба

ответа, однако аппликация джасплакинолида приводит к потенциации либо первого, либо второго в паре ответа, причём в зависимости от исходной вероятности выброса медиатора.

Можно предположить, что действие джасплакинолида направлено на одни и те же механизмы, которые определяют вероятность выброса медиатора и фасилитацию при парной стимуляции. К ним относятся механизмы регуляции входящего в пресинапс кальция, который, собственно, и стимулирует выброс медиатора [30, 50, 51, 85–87]. В то же время остаточный кальций взаимодействует с Ca^{2+} -сенсорами, способными усиливать фасилитацию при парной стимуляции [30, 51, 54, 55, 68, 88, 89]. Оба механизма, а также величина доступного пула медиатора реагируют на увеличение проводимости пресинаптических кальциевых каналов [68, 72, 88–93], хотя и в разной степени в зависимости от наличия реагирующих на остаточный кальций Ca^{2+} -сенсоров [54, 85, 88, 92, 94]. Взаимодействие F-актина с регуляторными субъединицами кальциевых каналов [29, 95] не исключает возможного влияния джасплакинолида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальный анализ кратковременной пластичности при парной стимуляции в переживающих срезах гиппокампа, инкубированных с активатором полимеризации актина джасплакинолидом, дополняет данные других исследований об участии актина в пресинаптических функциях. PPF-тест выявил разнонаправленные модификации PPF в зависимости от характера пресинаптической активности до аппликации. Величина PPF в основном обратнo пропорциональна вероятности выброса медиатора, и предполагаемое на этом основании увеличение вероятности выброса медиатора изначально низкоэффективных синапсов может быть связано либо с непосредственным активирующим действием джасплакинолида за счёт образования дополнительных филаментов, либо со стабилизацией тех модификаций, которые происходят вследствие гомеостатической регуляции пресинаптических функций [5, 38, 49, 90]. Однако это не может объяснить увеличения PPF в предположительно «высокоэффективных» синапсах, тем более что неизменная амплитуда первого ответа на фоне джасплакинолида свидетельствует против снижения вероятности выброса медиатора. Соответственно, потенцияция второго ответа может быть опосредована влиянием джасплакинолида на зависимые от F-актина механизмы кратковременной

пластичности при парной стимуляции, например, величину пула доступного медиатора или активность пресинаптических кальциевых каналов [29, 54]. Оба эффекта доминируют в зависимости от фоновой активности до аппликации джасплакинолида и имеют противоположную направленность, что, скорее всего, связано с асимптотическим ограничением прироста имеющих исходно высокие значения показателей. Так или иначе, актиновые филаменты обеспечивают транспорт, заякоривание и другие вспомогательные функции [51]. Интерпретация наших результатов в рамках представлений о роли F-актина в качестве существенного компонента сигнального комплекса активной зоны пресинапса приводит к заключению о влиянии джасплакинолида на компенсаторные модификации при активации девиантных синапсов.

Вклад автора. И.В. Кудряшова — концепция, проведение экспериментов и написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 гг. (AAAA-A17-117092040002-6). Дополнительное внешнее финансирование отсутствует.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эксперименты с животными выполнены в соответствии с требованиями международного и национального законодательства в области защиты и использования животных в экспериментальных исследованиях. Протокол эксперимента утверждён Этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Choquet, D., and Triller, A. (2013) The dynamic synapse, *Neuron*, **80**, 691-703, doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.013.
2. Meyer, D., Bonhoeffer, T., and Scheuss, V. (2014) Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity, *Neuron*, **82**, 430-443, doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.031.
3. Kudryashova, I. V. (2019) The molecular basis of destabilization of synapses as a factor of structural plasticity, *Neurochem. J.*, **13**, 3-13, doi: 10.1134/S1819712419010136.
4. Dillon, C., and Goda, Y. (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse, *Annu. Rev. Neurosci.*, **28**, 25-55, doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757.
5. Cingolani, L. A., and Goda, Y. (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy, *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 344-356, doi: 10.1038/nrn2373.
6. Ramachandran, B., and Frey, J. U. (2009) Interfering with the actin network and its effect on long-term potentiation and synaptic tagging in hippocampal CA1 neurons in slices *in vitro*, *J. Neurosci.*, **29**, 12167-12173, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2045-09.2009.
7. Rex, C. S., Gavin, C. F., Rubio, M. D., Kramar, E. A., Chen, L. Y., et al. (2010) Myosin IIB regulates actin dynamics during synaptic plasticity and memory formation, *Neuron*, **67**, 603-617, doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.016.
8. Krucker, T., Siggins, G. R., and Halpain, S. (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6856-6861, doi: 10.1073/pnas.100139797.
9. Kramar, E. A., Lin, B., Rex, C. S., Gall, C. M., and Lynch, G. (2006) Integrin-driven actin polymerization consolidates long-term potentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5579-5584, doi: 10.1073/pnas.0601354103.
10. Messaoudi, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dayte, G., et al. (2007) Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus *in vivo*, *J. Neurosci.*, **27**, 10445-10455, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007.
11. Galvez, B., Gross, N., and Sumikawa, K. (2016) Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors protects potentiated synapses from depotentiation during theta pattern stimulation in the hippocampal CA1 region of rats, *Neuropharmacology*, **105**, 378-387, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.008.
12. Shupliakov, O., Bloom, O., Gustafsson, J. S., Kjaerulff, O., Low, P., et al. (2002) Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14476-14481, doi: 10.1073/pnas.212381799.
13. Böhme, M. A., McCarthy, A. W., Grasskamp, A. T., Beuschel, C. B., Goel, P., et al. (2019) Rapid active zone remodeling consolidates presynaptic potentiation, *Nat. Commun.*, **10**, 1085, doi: 10.1038/s41467-019-08977-6.
14. Morales, M., Colicos, M. A., and Goda, Y. (2000) Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses, *Neuron*, **27**, 539-550, doi: 10.1016/s0896-6273(00)00064-7.
15. Sankaranarayanan, S., Atluri, P. P., and Ryan, T. A. (2003) Actin has a molecular scaffolding, not propul-

- sive, role in presynaptic function, *Nat. Neurosci.*, **6**, 127-135, doi: 10.1038/nn1002.
16. Rust, M. B., and Maritzen, T. (2015) Relevance of presynaptic actin dynamics for synapse function and mouse behavior, *Exp. Cell Res.*, **335**, 165-171, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.12.020.
17. Malinow, R., and Tsien, R. W. (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices, *Nature*, **46**, 177-180, doi: 10.1038/346177a0.
18. Malgaroli, A., Ting, A. E., Wendland, B., Bergamaschi, A., Villa, A., et al. (1995) Presynaptic component of long-term potentiation visualized at individual hippocampal synapses, *Science*, **268**, 1624-1628, doi: 10.1126/science.7777862.
19. Nicoll, R. A., and Malenka, R. C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, **377**, 115-118, doi: 10.1038/377115a0.
20. Blundon, J. A., and Zakharenko, S. S. (2008) Dissecting the components of long-term potentiation, *Neuroscientist*, **14**, 598-608, doi: 10.1177/1073858408320643.
21. Sokolov, M. V., Rossokhin, A. V., Astrelin, A. V., Frey, J. U., and Voronin, L. L. (2002) Quantal analysis suggests strong involvement of presynaptic mechanisms during the initial maintenance of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area *in vitro*, *Brain Res.*, **957**, 61-75, doi: 10.1016/s0006-8993(02)03600-4.
22. Emptage, N. J., Reid, C. A., Fine, A., and Bliss, T. V. (2003) Optical quantal analysis reveals a presynaptic component of LTP at hippocampal Schaffer-associational synapses, *Neuron*, **38**, 797-804, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00325-8.
23. Stanton, P. K., Winterer, J., Zhang, X. L., and Muller, W. (2005) Imaging LTP of presynaptic release of FM1-43 from the rapidly recycling vesicle pool of Schaffer collateral-CA1 synapses in rat hippocampal slices, *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 2451-2461, doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04437.x.
24. Bayazitov, I. T., Richardson, R. J., Fricke, R. G., and Zakharenko, S. S. (2007) Slow presynaptic and fast postsynaptic components of compound long-term potentiation, *J. Neurosci.*, **27**, 11510-11521, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3077-07.2007.
25. Kudryashova, I. V., Onufriev, M. V., and Gulyaeva, N. V. (2014) Caspase-3 and calpain: differently directed involvement in presynaptic long-term plasticity, *Neurochem. J.*, **8**, 162-167, doi: 10.1134/S181971241403009X.
26. Kuhnt, U., and Voronin, L. L. (1994) Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in area CA1 of guinea-pig hippocampal slices: application of quantal analysis, *Neuroscience*, **62**, 391-397, doi: 10.1016/0306-4522(94)90374-3.
27. Schulz, P. E., Cook, E. P., and Johnston, D. (1994) Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation, *J. Neurosci.*, **14**, 5325-5337, doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-09-05325.1994.
28. Yao, J., Qi, J., and Chen, G. (2006) Actin-dependent activation of presynaptic silent synapses contributes to long-term synaptic plasticity in developing hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, **26**, 8137-8147, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1183-06.2006.
29. Guzman, G. A., Guzman, R. E., Jordan, N., and Hidalgo, P. A. (2019) A tripartite interaction among the calcium channel α_1 - and β -subunits and F-actin increases the readily releasable pool of vesicles and its recovery after depletion, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 125, doi: 10.3389/fncel.2019.00125.
30. Zucker, R. S., and Regehr, W. G. (2002) Short-term synaptic plasticity, *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 355-405, doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.
31. Fioravante, D., and Regehr, W. G. (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **21**, 269-274, doi: 10.1016/j.conb.2011.02.003.
32. Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., and Fosen, K. M. (2000) Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain *in vivo* observations, *J. Biol. Chem.*, **275**, 5163-5170, doi: 10.1074/jbc.275.7.5163.
33. Lazarevic, V., Pothula, S., Andres-Alonso, M., and Fejtova, A. (2013) Molecular mechanisms driving homeostatic plasticity of neurotransmitter release, *Front. Cell Neurosci.*, **7**, 244, doi: 10.3389/fncel.2013.00244.
34. Davis, G. W., and Muller, M. (2015) Homeostatic control of presynaptic neurotransmitter release, *Annu. Rev. Physiol.*, **77**, 251-270, doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071740.
35. Ortega, J. M., Genç, Ö., and Davis, G. W. (2018) Molecular mechanisms that stabilize short term synaptic plasticity during presynaptic homeostatic plasticity, *eLife*, **7**, e40385, doi: 10.7554/eLife.40385.
36. Goel, P., Bergeron, D. D., Böhme, M. A., Nunnally, L., Lehmann, M., et al. (2019) Homeostatic scaling of active zone scaffolds maintains global synaptic strength, *J. Cell Biol.*, **18**, 1706-1724, doi: 10.1083/jcb.201807165.
37. Ivanov, A., Esclapez, M., Pellegrino, Ch., Shirao, T., and Ferhat, L. (2009) Drebrin A regulates dendritic spine plasticity and synaptic function in mature cultured hippocampal neurons, *J. Cell Sci.*, **122**, 524-534, doi: 10.1242/jcs.033464.
38. Bleckert, A., Photowala, H., and Alford, S. (2012) Dual pools of actin at presynaptic terminals, *J. Neurophysiol.*, **107**, 3479-3492, doi: 10.1152/jn.00789.2011.
39. Andrade, A. L., and Rossi, D. J. (2010) Simulated ischaemia induces Ca^{2+} -independent glutamatergic vesicle release through actin filament depolymerization in area CA1 of the hippocampus, *J. Physiol.*, **588**, 1499-1514, doi: 10.1113/jphysiol.2010.187609.

40. Rex, C. S., Chen, L. Y., Sharma, A., Liu, J., Babayan, A. H., et al. (2009) Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation, *J. Cell Biol.*, **186**, 85-97, doi: 10.1083/jcb.200901084.
41. Gaviño, M. A., Ford, K. J., Archila, S., and Davis, G. W. (2015) Homeostatic synaptic depression is achieved through a regulated decrease in presynaptic calcium channel abundance, *eLife*, **4**, e05473, doi: 10.7554/eLife.05473.
42. Bloom, O., Evergren, E., Tomilin, N., Kjaerulff, O., Low, P., et al. (2003) Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling, *J. Cell Biol.*, **161**, 737-747, doi: 10.1083/jcb.200212140.
43. Zhang, W., and Benson, D. L. (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin, *J. Neurosci.*, **21**, 5169-5181, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-14-05169.2001.
44. Ackermann, F., Waites, C. L., and Garner, C. C. (2015) Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates, *EMBO Rep.*, **16**, 923-938, doi: 10.15252/embr.201540434.
45. Südhof, T. C. (2012) The presynaptic active zone, *Neuron*, **75**, 11-25, doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.012.
46. Lee, J. S., Ho, W. K., Neher, E., and Lee, S. H. (2013) Superpriming of synaptic vesicles after their recruitment to the readily releasable pool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 15079-15084, doi: 10.1073/pnas.1314427110.
47. Ghelani, T., and Sigrist, S. J. (2018) Coupling the structural and functional assembly of synaptic release sites, *Front. Neuroanat.*, **12**, 81, doi: 10.3389/fnana.2018.00081.
48. Halpain, S. (2003) Actin in a supporting role, *Nat. Neurosci.*, **6**, 101-102, doi: 10.1038/nn0203-101.
49. Miki, T., Malagon, G., Pulido, C., Llano, I., Neher, E., et al. (2016) Actin- and myosin- dependent vesicle loading of presynaptic docking sites prior to exocytosis, *Neuron*, **91**, 808-823, doi: 10.1016/j.neuron.2016.07.033.
50. Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., et al. (2012) Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone, *Nat. Neurosci.*, **15**, 988-997, doi: 10.1038/nn.3137.
51. Körber, Ch., and Kuner, Th. (2016) Molecular machines regulating the release probability of synaptic vesicles at the active zone, *Front. Synapt. Neurosci.*, **8**, 5, doi: 10.3389/fnsyn.2016.00005.
52. Bruckner, J. J., Zhan, H., Gratz, S. J., Rao, M., Ukken, F., et al. (2017) Fife organizes synaptic vesicles and calcium channels for high-probability neurotransmitter release, *J. Cell Biol.*, **216**, 231-246, doi: 10.1083/jcb.201601098.
53. Gustafsson, B., Ma, R., and Hanse, E. (2019) The small and dynamic pre-primed pool at the release site; A useful concept to understand release probability and short-term synaptic plasticity? *Front. Synapt. Neurosci.*, **11**, 7, doi: 10.3389/fnsyn.2019.00007.
54. Mochida, S. (2019) Presynaptic calcium channels, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2217, doi: 10.3390/ijms20092217.
55. Leal-Ortiz, S., Waites, C. L., Terry-Lorenzo, R., Zamorano, P., Gundelfinger, E. D., et al. (2008) Piccolo modulation of synapsin1a dynamics regulates synaptic vesicle exocytosis, *J. Cell Biol.*, **181**, 831-846, doi: 10.1083/jcb.200711167.
56. Waites, C. L., Leal-Ortiz, S. A., Andlauer, T. F., Sigrist, S. J., and Garner, C. C. (2011) Piccolo regulates the dynamic assembly of presynaptic F-actin, *J. Neurosci.*, **31**, 14250-14263, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1835-11.2011.
57. Dason, J. S., Smith, A. J., Marin, L., and Charlton, M. P. (2014) Cholesterol and F-actin are required for clustering of recycling synaptic vesicle proteins in the presynaptic plasma membrane, *J. Physiol.*, **592**, 621-633, doi: 10.1113/jphysiol.2013.265447.
58. Sakaba, T., and Neher, E. (2003) Involvement of actin polymerization in vesicle recruitment at the calyx of Held synapse, *J. Neurosci.*, **23**, 837-846, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-03-00837.2003.
59. Gundelfinger, E. D., and Fejtova, A. (2012) Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **22**, 423-430, doi: 10.1016/j.conb.2011.10.005.
60. Lee, J. S., Ho, W. K., and Lee, S. H. (2012) Actin-dependent rapid recruitment of reluctant synaptic vesicles into a fast-releasing vesicle pool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E765-E774, doi: 10.1073/pnas.1114072109.
61. Engholm-Keller, K., Waardenberg, A. J., Müller, J. A., Wark, J. R., Fernando, R. N., et al. (2019) The temporal profile of activity-dependent presynaptic phospho-signalling reveals long-lasting patterns of poststimulus regulation, *PLoS Biol.*, **17**, e3000170, doi: 10.1371/journal.pbio.3000170.
62. Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity, *Nat. Neurosci.*, **7**, 1104-1112, doi: 10.1038/nn1311.
63. Holzinger, A. (2009) Jasplakinolide: an actin-specific reagent that promotes actin polymerization, *Meth. Mol. Biol.*, **586**, 71-87, doi: 10.1007/978-1-60761-376-3_4.
64. Kudryashova, I. V. (2021) The reorganization of the actin matrix as a factor of presynaptic plasticity, *Neurochem. J.*, **15**, 217-225, doi: 10.1134/S1819712421030089.
65. Kudryashova, I. V. (2022) Inhibitory control of short-term plasticity during paired pulse stimulation depends on actin polymerization, *Neurochem. J.*, **16**, 136-146, doi: 10.1134/S1819712422020106.
66. Sun, H. Y., Li, Q., Bartley, A. F., and Dobrunz, L. E. (2018) Target-cell-specific short-term plasticity

- reduces the excitatory drive onto CA1 interneurons relative to pyramidal cells during physiologically-derived spike trains, *Neuroscience*, **388**, 430-447, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.07.051.
67. Sullivan, J. M. (2007) A simple depletion model of the readily releasable pool of synaptic vesicles cannot account for paired-pulse depression, *J. Neurophysiol.*, **97**, 948-950, doi: 10.1152/jn.00554.2006.
 68. Catterall, W. A., Leal, K., and Nanou, E. (2013) Calcium channels and short-term synaptic plasticity, *J. Biol. Chem.*, **288**, 10742-10749, doi: 10.1074/jbc.R112.411645.
 69. Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 404-414, doi: 10.1038/nrm1940.
 70. Verstegen, A. M., Tagliatti, E., Lignani, G., Marte, A., Stoloro, T., et al. (2014) Phosphorylation of synapsin I by cyclin-dependent kinase-5 sets the ratio between the resting and recycling pools of synaptic vesicles at hippocampal synapses, *J. Neurosci.*, **34**, 7266-7280, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3973-13.2014.
 71. Wu, X. S., Lee, S. H., Sheng, J., Zhang, Z., Zhao, W. D., et al. (2016) Actin is crucial for all kinetically distinguishable forms of endocytosis at synapses, *Neuron*, **92**, 1020-1035, doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.014.
 72. Kaeser, P. S., and Regehr, W. G. (2017) The readily releasable pool of synaptic vesicles, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **43**, 63-70, doi: 10.1016/j.conb.2016.12.012.
 73. Bourne, J., Morgan, J. R., and Pieribone, V. A. (2006) Actin polymerization regulates clathrin coat maturation during early stages of synaptic vesicle recycling at lamprey synapses, *J. Comp. Neurol.*, **497**, 600-609, doi: 10.1002/cne.21006.
 74. Bahler, M., and Greengard, P. (1987) Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner, *Nature*, **326**, 704-707, doi: 10.1038/326704a0.
 75. Rosahl, T. W., Geppert, M., Spillane, D., Herz, J., Hammer, R. E., et al. (1993) Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I, *Cell*, **75**, 661-670, doi: 10.1016/0092-8674(93)90487-b.
 76. Vasileva, M., Horstmann, H., Geumann, C., Gitler, D., and Kuner, T. (2012) Synapsin-dependent reserved pool of synaptic vesicles supports replenishment of the readily releasable pool under intense synaptic transmission, *Eur. J. Neurosci.*, **36**, 3005-3020, doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08225.x.
 77. Orlando, M., Lignani, G., Maragliano, L., Fassio, A., Onofri, F., et al. (2014) Functional role of ATP binding to synapsin I in synaptic vesicle trafficking and release dynamics, *J. Neurosci.*, **34**, 14752-14768, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1093-14.2014.
 78. Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Perez, M., Davis, M. W., Sohl-Kielczynski, B., et al. (2013) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses, *Nature*, **504**, 242-247, doi: 10.1038/nature12809.
 79. Rozov, A., and Burnashev, N. (1999) Polyamine-dependent facilitation of postsynaptic AMPA receptors counteracts paired-pulse depression, *Nature*, **401**, 594-598, doi: 10.1038/44151.
 80. Brody, D. L., and Yue, D. T. (2000) Release-independent short-term synaptic depression in cultured hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, **20**, 2480-2494, doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-07-02480.2000.
 81. Nanou, E., and Catterall, W. A. (2018) Calcium channels, synaptic plasticity, and neuropsychiatric disease, *Neuron*, **98**, 466-481, doi: 10.1016/j.neuron.2018.03.017.
 82. Chamberland, S., Evstratova, A., and Toth, K. (2014) Interplay between synchronization of multivesicular release and recruitment of additional release sites support short-term facilitation at hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cells synapses, *J. Neurosci.*, **34**, 11032-11047, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0847-14.2014.
 83. Rajappa, R., Gauthier-Kemper, A., Böning, D., Hüve, J., and Klingauf, J. (2016) Synaptophysin 1 clears synaptobrevin 2 from the presynaptic active zone to prevent short-term depression, *Cell Rep.*, **14**, 1369-1381, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.031.
 84. Hruska, M., Henderson, N., Le Marchand, S. J., Jafri, H., and Dalva, M. B. (2018) Synaptic nanomodules underlie the organization and plasticity of spine synapses, *Nat. Neurosci.*, **21**, 671-682, doi: 10.1038/s41593-018-0138-9.
 85. Catterall, W. A., and Few, A. P. (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity, *Neuron*, **59**, 882-901, doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.005.
 86. Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S. P., and Jonas, P. (2012) Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses, *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 7-21, doi: 10.1038/nrn3125.
 87. Scimemi, A., and Diamond, J. S. (2012) The number and organization of Ca²⁺ channels in the active zone shapes neurotransmitter release from schaffer collateral synapses, *J. Neurosci.*, **32**, 18157-18176, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3827-12.2012.
 88. Yan, J., Leal, K., Magupalli, V. G., Nanou, E., Martinez, G. Q., et al. (2014) Modulation of Ca_v2.1 channels by neuronal calcium sensor-1 induces short-term synaptic facilitation, *Mol. Cell Neurosci.*, **63**, 124-131, doi: 10.1016/j.mcn.2014.11.001.
 89. Nanou, E., Sullivan, J. M., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2016) Calcium sensor regulation of the Ca_v2.1 Ca²⁺ channel contributes to short-term synaptic plasticity in hippocampal neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 1062-1067, doi: 10.1073/pnas.1524636113.
 90. Mochida, S. (2011) Activity-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis and presynaptic short-term plasticity, *Neurosci. Res.*, **70**, 16-23, doi: 10.1016/j.neures.2011.03.005.

91. Zhao, C., Dreosti, E., and Lagnado, L. (2011) Homeostatic synaptic plasticity through changes in presynaptic calcium influx, *J. Neurosci.*, **31**, 7492-7496, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6636-10.2011.
92. Leal, K., Mochida, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2012) Fine-tuning synaptic plasticity by modulation of Ca_v2.1 channels with Ca²⁺ sensor proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 17069-17074, doi: 10.1073/pnas.1215172109.
93. Thanawala, M. S., and Regehr, W. G. (2013) Presynaptic calcium influx controls neurotransmitter release in part by regulating the effective size of the readily-releasable pool, *J. Neurosci.*, **33**, 4625-4633, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4031-12.2013.
94. Lee, A., Westenbroek, R. E., Haeseleer, F., Palczewski, K., Scheuer, T., et al. (2002) Differential modulation of Ca_v2.1 channels by calmodulin and Ca²⁺-binding protein 1, *Nat Neurosci.*, **5**, 210-217, doi: 10.1038/nn805.
95. Magupalli, V. G., Mochida, S., Yan, J., Jiang, X., Westenbroek, R. E., et al. (2013) Ca²⁺-independent activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain of Ca_v2.1 calcium channels, *J. Biol. Chem.*, **288**, 4637-4648, doi: 10.1074/jbc.M112.369058.

PRESYNAPTIC PLASTICITY IS ASSOCIATED WITH ACTIN POLYMERIZATION

I. V. Kudryashova

*Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System,
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia; e-mail: iv_kudryashova@mail.ru*

Modifications of presynaptic short-term plasticity as a result of actin polymerization were tested in rat hippocampal slices using a paired-pulse paradigm. Paired-pulse stimulation of Schaffer collaterals with 70 ms interpulse interval was continuously presented every 30 s before and during perfusion with jasplakinolide, an activator of actin polymerization. Jasplakinolide application resulted in the potentiation of CA3-CA1 responses accompanied by paired-pulse facilitation decrease, these effects suggesting presynaptic modifications. The jasplakinolide-induced potentiation significantly depended on the initial paired-pulse facilitation values. These data indicate that jasplakinolide-mediated changes in actin polymerization may promote high probability of release. Less typical for CA3-CA1 synapses responses with very low initial paired-pulse facilitation or paired-pulse depression (close to 1 or even lower) demonstrated the potentiation of the second, but not the first amplitude in a pair, paired-pulse ratio significantly increasing from 0.8 to 1.0 in average. This may suggest a negative impact of jasplakinolide on the mechanisms underlying paired-pulse depression. Nonetheless, actin polymerization promotes potentiation, though patterns of this activation may differ depending on initial input characteristics. We conclude that in addition to increased neurotransmitter release probability other mechanisms known to suppress paired pulse facilitation may be also involved in effects of jasplakinolide.

Keywords: hippocampus, presynaptic plasticity, paired-pulse facilitation, paired-pulse depression, actin polymerization, jasplakinolide

РОЛЬ BDNF В НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЛКОГОЛЯ

Обзор

© 2023 Д.И. Перегуд^{1,2*}, В.Ю. Баронец¹, Н.Н. Теребилина¹, Н.В. Гуляева^{2,3}

¹ Национальный научный центр наркологии — ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, 119002 Москва, Россия; электронная почта: peregud_d@yahoo.com

² ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия

³ ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева» Департамента здравоохранения города Москвы, 115419 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.11.2022

После доработки 21.11.2022

Принята к публикации 21.11.2022

Хроническое воздействие алкоголя характеризуется нарушениями нейропластичности, при этом нейротрофический фактор мозга (BDNF) может являться ключевым звеном молекулярных механизмов этого патологического процесса. Цель обзора — анализ актуальных данных литературы, полученных в исследованиях на животных и клиническом материале, относительно участия BDNF в нейропластичности в условиях формирования зависимости от алкоголя. В экспериментах на грызунах продемонстрировано, что при потреблении алкоголя происходят регион-специфичные изменения уровня BDNF, что может сопровождаться структурными перестройками нейронов и нарушениями различных форм поведения. При этом BDNF нивелирует нарушения нейропластических процессов, вызванных воздействием алкоголя. Согласно результатам клинических исследований, показатели, характеризующие BDNF, связаны с нарушениями нейропластичности, которые сопровождают алкогольную зависимость. Так, полиморфизм rs6265 гена *BDNF* может отражать специфику макроструктурных изменений ЦНС, тогда как периферическая концентрация BDNF ассоциирована с уровнем тревожности и депрессивности, а также выраженностью когнитивных нарушений. Таким образом, BDNF вовлечён в механизмы нейропластичности при алкогольной зависимости, при этом показатели, характеризующие BDNF, могут быть использованы в качестве биомаркеров, диагностического или прогностического фактора в наркологической практике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: BDNF, нейропластичность, алкоголь, зависимость.

DOI: 10.31857/S0320972523030090, **EDN:** QXIDMI

ВВЕДЕНИЕ

Патологическая зависимость от алкоголя наносит колоссальный социально-экономический ущерб. Согласно аналитическому обзору о работе наркологической службы в Российской Федерации за период 2019–2020 гг., общая заболеваемость (учтённая распространённость) расстройствами наркологического профиля в 2020 г. составила 1203,5 на 100 000

населения [1]. Из них на долю расстройств, связанных со злоупотреблением алкоголя, приходилось 934,1 случая. Суммарные экономические потери от алкогольной зависимости в 2017 г. в России составили от 302,8 млрд до 2,5 трлн рублей, при этом принесли вред здоровью 3,9 млн лет потерянной жизни с учётом нетрудоспособности (DALY, Disability Adjusted Life Years) [2]. В связи с этим всестороннее изучение механизмов алкогольной

Принятые сокращения: Arc — белок, связанный с цитоскелетом и регулируемый активностью; BDNF — нейротрофический фактор мозга; CREB — CRE-связывающий белок; ERK — протеинкиназы, регулируемые внеклеточными сигналами; FAB — батарея тестов для оценки лобной дисфункции; MAPK — митоген-активируемые протеинкиназы; TrkB — тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор BDNF; 7,8-ДГФ — 7,8-дигидроксифлаван.

* Адресат для корреспонденции.

зависимости представляется актуальным направлением исследований.

Эффект алкоголя детерминирован на генетическом уровне и определяется эпигенетическими механизмами, транскрипционной активностью, альтернативным сплайсингом, активностью трансляции и посттрансляционными модификациями, что в конечном итоге контролирует функционирование ЦНС в условиях патологического процесса [3]. Под действием алкоголя изменяются ключевые свойства нервной ткани: нарушаются процессы возбудимости, передачи нервного импульса и синаптической пластичности в определённых нейронных сетях [4]. Хроническое действие этанола сопровождается изменением функционирования в отделах головного мозга, ответственных за процессы подкрепления и мотивации (стриатум и вентральная область покрышки), контроля принятия решений (фронтальная часть неокортекса), восприимчивости к стрессу (амигдаларный комплекс), формирования памяти и эмоций (гиппокамп) [4, 5]. Действие этанола на мозг регионально-специфично, что, в свою очередь, зависит от репертуара экспрессируемых молекулярных мишеней в конкретных популяциях нейронов и чувствительностью к этанолу [4, 5].

Хроническое действие высоких доз алкоголя характеризуется атрофическими и нейродегенеративными процессами как на клеточном, так и на макроструктурном уровнях, что показано и прижизненно на пациентах, и на посмертном материале, а также в экспериментах на животных [6]. Предполагается, что в основе развития феноменов сенситизации, толерантности, зависимости и синдрома отмены, связанных с потреблением алкоголя, лежат адаптивные процессы на всех уровнях организации ЦНС [5]. Хроническая интоксикация алкоголем зачастую сопровождается развитием аффективных расстройств и когнитивного дефицита [5, 7], которые рассматриваются как результат нарушения нейропластичности [8–10].

Описан ряд нейрохимических систем, вовлечённых в механизмы комплексного воздействия алкоголя на ЦНС, включая лиганд- и потенциал-зависимые ионные каналы, дофамин, серотонин, ГАМК, глутамат, опиоидные пептиды, эндоканнабиноиды, субстанция Р, орексин, аденозин и др. [5, 6]. Среди прочих систем, вовлечённых в данный процесс, особая роль уделяется нейротрофинам, которые являются важным звеном молекулярных механизмов, определяющих действие алкоголя и формирование зависимости [11, 12]. Нейротрофический фактор мозга (BDNF, brain-

derived neurotrophic factor) является ключевым нейротрофином в данном контексте [13, 14]. BDNF проявляет нейрорегуляторные свойства и модулирует эффективность передачи импульса в существующих синапсах, а также вовлечён в формирование новых контактов между нейронами, а нарушения функционирования BDNF за счёт изменения его экспрессии или секреции ассоциированы с патологическими изменениями в функционировании нервной ткани и последующим нарушением поведения [15]. Экспериментальные данные, полученные в модельных системах, свидетельствуют о том, что BDNF может играть определяющую роль в нейропластических изменениях при развитии зависимости, которые, с одной стороны, могут определять собственно патологическое влечение к алкоголю, с другой стороны, могут быть вовлечены в механизмы развития морфологических нарушений, а также когнитивных и психоэмоциональных расстройств [7]. Алкогольная интоксикация и сопутствующее формирование зависимости сопровождаются изменением экспрессии BDNF в отделах головного мозга, что, по всей видимости, является основой функциональной активности BDNF в условиях развития зависимости и сопутствующих пластических изменений в ЦНС [12].

Манипуляция уровнем BDNF может оказывать влияние на интенсивность потребления этанола в условиях свободного выбора, а также проявления алкогольной абстиненции в эксперименте. Так, гетерозиготные мыши, нокаутированные по гену *Bdnf*^{+/-}, демонстрируют повышенное по сравнению с диким типом потребление алкоголя в условиях свободного выбора [16, 17]. Локальное снижение уровня BDNF в стриатуме посредством интерферирующих РНК приводит к увеличению уровня потребления этанола, тогда как инфузия BDNF в этот отдел мозга снижает потребление этанола [18]. Пребывание мышей в парах этанола в условиях прерывистого субхронического режима сопровождается снижением уровня белка BDNF в префронтальной коре мышей в период ранней абстиненции [19]. При этом локальное повышение BDNF в данной области в последующем снижает уровень потребляемого этанола в условиях свободного выбора [19]. Можно полагать, что BDNF в стриатуме и неокортексе контролирует переход от умеренного к чрезмерному потреблению алкоголя, что стимулирует развитие зависимости; таким образом, при умеренном потреблении уровень BDNF повышается и противодействует мотивации, а при чрезмерном, напротив, снижается [11, 14].

Цель настоящего обзора — проанализировать данные относительно участия BDNF в нейропластичности, а точнее в её нарушении, в условиях формирования зависимости от алкоголя. Будут представлены результаты, полученные в исследованиях на экспериментальных животных и клиническом материале.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Сигнальные каскады, опосредованные BDNF.

Согласно классическим представлениям, после связывания зрелого белка BDNF с рецептором TrkB, обладающим тирозинкиназной активностью, образуются гомодимеры рецептора, результатом чего является аутофосфорилирование, составляющее основу инициации нижележащих молекулярных событий [20–23]. Фосфорилирование TrkB приводит к связыванию и фосфорилированию адаптерного белка Shc. Shc, с одной стороны, иницирует каскад фосфоинозитид-3-киназа (PI3K, phosphoinositide 3-kinase)/протеинкиназа АКТ, с другой — повышает активность малых GTPаз семейства RAS, что в последующем может стимулировать митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK, mitogen activated protein kinase).

Каждому элементу внутриклеточного сигнального каскада, иницируемого рецептором TrkB, соответствует своя функция [22]. Сигнальный каскад PI3K/АКТ оказывает негативное влияние на развитие апоптоза, тем самым стимулируя выживаемость нейронов, а также модулирует синаптическую пластичность, опосредованную глутаматными рецепторами NMDA-подтипа. Стимуляцию протеинкиназы mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) посредством PI3K/АКТ связывают с белковым синтезом и изменениями в цитоскелете, которые лежат в основе роста и ветвления дендритов. Сигнальный каскад, включающий протеинкиназы каскада MAPK, важен для активации нижележащих транскрипционных факторов, например, CRE-связывающего белка CREB (cAMP-response element-binding protein), который обеспечивает экспрессию генов и последующий синтез белков цитоскелета, участвующих в синаптогенезе. Активация малых GTPаз семейства Rho, таких как Rac1 и Cdc42, стимулирует синтез актина и микротрубочек, иницируя рост отростков нейронов и поддержание долговременной потенциации.

В работах на культурах нейронов было продемонстрировано, что этанол способен влиять на функциональную активность запускаемых BDNF внутриклеточных сигнальных

каскадов. При культивировании нейронов стриатума в присутствии этанола отмечается активация TrkB, последующая активация протеинкиназ каскада MAPK и увеличение экспрессии препродинарфина [24]. С другой стороны, в гранулярных нейронах мозжечка в присутствии этанола снижается как базальный уровень, так и уровень индуцированной BDNF активной фосфорилированной формы протеинкиназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK, extracellular signal-regulated kinase), что свидетельствует о снижении активности каскада MAPK [25]. Также в гранулярных нейронах мозжечка этанол тормозит вызванную обработкой BDNF активацию каскада PI3K/АКТ, протеинкиназы JNK (Jun N-terminal kinase) и транскрипционного фактора AP-1 (activating protein-1) [26]. В культуре фетальных пирамидных нейронов гиппокампа крыс этанол увеличивает площадь поверхности конусов роста аксонов, при этом отмечается снижение BDNF-зависимой активации малых GTPаз Rac1 и Cdc42, вовлечённых в реализацию роста аксонов [27].

Морфологические нарушения, развитие тревожно-подобного фенотипа и BDNF. Нокаут *Bdnf* в ЦНС не сопровождается сокращением числа нейронов, но приводит к снижению плотности шипиков дендритов и ветвления дендритов [28, 29]. BDNF обеспечивает рост шипиков дендритов [30], тем самым регулируя синаптогенез и функционирование зрелых нейронных сетей. В ряде работ описана ассоциация морфологических изменений в ЦНС после субхронической алкогольной интоксикации с развитием тревожно-подобных нарушений поведения и активностью сигнальных каскадов, иницируемых BDNF [31–35].

В результате потребления раствора этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 21 дня у крыс развивается зависимость и тревожно-подобные расстройства поведения в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» в период ранней абстиненции, что сопровождается снижением содержания мРНК, белка BDNF и числа клеток, экспрессирующих BDNF, в гиппокампе и прилежащем ядре, а также ультраструктурными изменениями синапсов в данных отделах, включая увеличение ширины синаптической щели, снижение толщины областей постсинаптической плотности и кризисы синапсов [31].

Этанол при остром системном введении оказывает анксиолитическое действие на крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», увеличивает содержание BDNF и белка Arc,

связанного с цитоскелетом и регулируемого активностью (activity regulated cytoskeleton associated protein), а также плотность шипиков дендритов в центральной и медиальной амигдале [32]. Через 24 часа после отмены потребления раствора алкоголя в составе сбалансированной жидкой диеты Либера–ДеКарли на протяжении 15 дней, напротив, отмечается снижение уровня белков BDNF и Arc, а также активных фосфорилированных форм протеинкиназы ERK и транскрипционных факторов Elk и CREB, снижение плотности шипиков дендритов в центральной и медиальной амигдале и развитие тревожно-подобного фенотипа, согласно результатам теста «приподнятый крестообразный лабиринт» [32]. BDNF при инфузии в центральную амигдалу при ранней абстиненции нормализует содержание Arc, активных фосфорилированных форм протеинкиназы ERK, транскрипционных факторов Elk и CREB, а также оказывает анксиолитическое действие [32]. Активация гистондеацетилаз является причиной снижения экспрессии BDNF и Arc, и, как следствие, развития дефицита дендритогенеза в центральной и медиальной амигдале, а также тревожно-подобного фенотипа в период ранней абстиненции через 24 часа после отмены потребления раствора этанола в составе сбалансированной жидкой диеты Либера–ДеКарли на протяжении 15 дней [33]. Кроме того, линия крыс, предпочитающих алкоголь, характеризуется врожденным тревожно-подобным фенотипом, дефицитом экспрессии BDNF и Arc, а также сниженной плотностью шипиков дендритов в центральной амигдале по сравнению с крысами, отвергающими этанол [34]. Острое системное воздействие этанола у линии крыс, предпочитающих, но не отвергающих алкоголь, снижает тревожно-подобное поведение в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «светлая/темная камера», увеличивает содержание BDNF и Arc, а также плотность шипиков дендритов в центральной и медиальной амигдале [34]. В основе уменьшения экспрессии BDNF и Arc у линии крыс, предпочитающих алкоголь, лежит снижение уровня ацетилированного гистона H3 в положениях K9 и K19, опосредованное увеличением активности гистондеацетилазы HDAC2 [35]. Таким образом, согласно гипотетической модели, основанной на серии работ под руководством S.C. Pandey [32–35], BDNF-зависимая экспрессия Arc за счёт влияния на каскад ERK/CREB/Elk играет роль в изменении морфологии синапсов в амигдале, что лежит в основе развития тревожно-подобного поведения в контексте действия

алкоголя. При этом экспрессия амигдаларного BDNF под действием алкоголя регулируется эпигенетически на уровне гистоновом коде посредством гистондеацетилаз.

Когнитивные нарушения и BDNF. Хроническая алкогольная интоксикация нередко связана с развитием когнитивного дефицита, формирование которого может быть ассоциировано с BDNF. В гиппокампе мышей потребление раствора этанола в условиях свободного выбора на протяжении 3 недель приводит к снижению уровня метилированной ДНК в регуляторных областях гена *Bdnf*, а также активации сигнальных каскадов, опосредованных TrkB, в частности, отмечается увеличение уровня активных (фосфорилированных) протеинкиназ ERK и AKT, а также транскрипционного фактора CREB [36]. Изменения активности каскадов, инициируемых BDNF, сопровождалось нарушениями формирования обучения и памяти в тестах «выработка условно-рефлекторной реакции страха» и «узнавание нового объекта» [36]. Таким образом, в гиппокампе так же, как и в амигдале, экспрессия BDNF в условиях воздействия алкоголя детерминирована эпигенетически, при этом в данном отделе содержание BDNF ассоциировано с когнитивным дефицитом. Основываясь на своих результатах, Stragier et al. [36] делают заключение, что повышение экспрессии BDNF и, как результат, активности соответствующих сигнальных каскадов в гиппокампе, носит реактивный характер и противодействует нарушениям когнитивных функций в условиях потребления алкоголя. С другой стороны, у крыс, потреблявших алкоголь в условиях свободного выбора, наблюдается пониженный уровень BDNF в плазме крови и мРНК *Bdnf* в гиппокампе, при этом уровень BDNF коррелирует с изменениями в формировании памяти в тесте «узнавание нового объекта» [37]. В частности, выявлена положительная корреляция между уровнем BDNF в плазме и временем обследования знакомого объекта, тогда как между уровнем мРНК *Bdnf* в гиппокампе и индексом дискриминации выявлена отрицательная корреляция [37]. Кроме того, влияние некоторых препаратов на когнитивные способности может быть опосредовано BDNF. Так, было показано, что введение аналога пептида тафтсина селанка, проявляющего анксиолитические и ноотропные свойства, в период абстиненции после 30 недель потребления алкоголя увеличивает индекс дискриминации в тесте «узнавание нового объекта», а также препятствует этанол-индуцированному повышению уровня BDNF во фронтальной коре и гиппокампе [38].

Функциональная активность синапсов и BDNF. BDNF, модулируя функционирование синапсов, имеет критическое значение в регуляции проведения нервного импульса. Пептид BDNF активно транспортируется к терминалям аксонов и секретируется в синаптическую щель после деполяризации мембраны [39, 40]. Модуляция передачи нервного импульса осуществляется пресинаптически за счёт влияния на эффективность высвобождения нейротрансмиттеров [41] либо постсинаптически посредством усиления действия нейротрансмиттеров с последующим изменением функциональности соответствующих рецепторов [42]. Для реализации данных механизмов влияния на передачу нервного импульса требуется связывание BDNF с рецептором TrkB, который представлен как на пре-, так и на постсинаптической мембранах.

В пирамидных нейронах поля гиппокампа CA3 BDNF стимулирует спонтанные постсинаптические токи, опосредуемые рецепторами ГАМК-А, при этом данный процесс зависит от активности потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа. Было установлено, что воздействие паров этанола на неонатальных крыс в герметичной камере, а также обработка срезов поля гиппокампа CA3 этанолом блокируют способность BDNF стимулировать долговременную потенциацию, опосредованную ГАМК-А рецепторами, за счёт ингибирования потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа [43]. В срезах гиппокампа и неокортекса мышей BDNF стимулирует постсинаптические токи в пирамидных нейронах, опосредованные NMDA-, но не AMPA-рецепторами, однако обработка срезов этанолом блокирует эффект BDNF [44].

При ранней абстиненции после прерывистого доступа к 20%-ному раствору этанола в режиме свободного выбора в течение 3 недель у мышей, согласно тестам «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», отмечалось развитие тревожно-подобного фенотипа. Это сопровождалось усилением передачи нервного импульса, опосредованного глутаматом, в пирамидных нейронах базолатеральной амигдалы, о чём свидетельствовало увеличение частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических токов в соответствующих срезах [45]. Однократное системное введение миметика BDNF 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДГФ) в период отмены алкоголя ослабляло как тревожно-подобное поведение, так и возбудимость пирамидных нейронов в базолатеральной амигдале, тогда как ингибитор тирозинкиназной активности K252a предотвра-

щал эффект 7,8-ДГФ [45]. Данные результаты свидетельствуют о том, что стимуляция TrkB посредством BDNF может ослаблять проявления отмены алкоголя за счёт нормализации активности нейронов в амигдале. Тем не менее системное введение 7,8-ДГФ на протяжении реализации модели прерывистого доступа к 20%-ному раствору этанола в режиме свободного выбора в течение 6 недель незначительно влияло на тревожно-подобное поведение при ранней абстиненции у крыс, согласно тестам «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» [46]. По всей видимости, влияние активации TrkB с помощью 7,8-ДГФ на поведенческие проявления алкогольной абстиненции (в данном случае – развитие тревожно-подобного фенотипа) может зависеть от вида экспериментальных животных, длительности потребления алкоголя, а также режима введения 7,8-ДГФ.

Нейрогенез и BDNF. Потребление этанола может влиять на нейрогенез в зрелом возрасте, как стимулируя пролиферацию клеток предшественников нейронов [47], так и тормозя её [48, 49], что, видимо, зависит от модели потребления алкоголя и временной точки исследования в процессе реализации интоксикации. Учитывая, что BDNF вовлечён в механизмы нейрогенеза [50], логично полагать, что этанол и BDNF могут взаимодействовать при нарушениях данных процессов.

Потребление раствора этанола в условиях свободного выбора на протяжении 3 недель приводит к увеличению экспрессии мРНК и белка BDNF, а также числа клеток, экспрессирующих BDNF, в гиппокампе мышей. В основе этого лежат посттрансляционные модификации гистонов в регуляторных областях гена, которые сопровождаются увеличением выживаемости и дифференцировки клеток в субгранулярной зоне зубчатой фасции [51]. При этом введение антагониста рецептора TrkB (ANA-12) в период предоставления свободного выбора между раствором этанола и водой, не оказывая влияния на потребление алкоголя, подавляет нейрогенез, сопровождающий потребление алкоголя, что может свидетельствовать о компенсаторной роли BDNF в данном контексте [51]. При острой отмене хронического прерывистого доступа к парам этанола в герметичной камере на протяжении 7 недель на фоне увеличения числа пролиферирующих клеток регистрируется увеличение содержания белка BDNF и активной фосфорилированной формы TrkB в гиппокампе, тогда как при длительной абстиненции на протяжении 3 недель отмечается снижение экспрессии BDNF

Таблица 1. Взаимосвязь BDNF и проявлений нейропластичности в условиях воздействия этанола в модельных системах

Вид, линия, пол	Модель потребления алкоголя	Временная точка	Отдел мозга	Показатели	Взаимосвязь с BDNF	Источник
Крысы Sprague-Dawley, самцы	3 → 9%-ный раствор, 21 день, единственный источник жидкости	ранняя абстиненция (48 часа)	гиппокамп, прилежащее ядро	экспрессия BDNF ↓; ширина синаптической щели ↑; толщина областей постсинаптической плотности ↓; кривизна синапсов ↓	косвенная взаимосвязь с BDNF	[31]
Крысы Sprague-Dawley, самцы	9%-ный раствор, 15 дней, жидкая диета Либера–ДеКарли	ранняя абстиненция (24 часа)	центральная и медиальная амигдала	экспрессия BDNF ↓; экспрессия Arc ↓; фосфорилированные формы ERK, Elk и CREB ↓; плотность шипиков дендритов ↓; тревожно-подобное поведение ↑	прямая взаимосвязь с BDNF в отношении экспрессии и поведения; инфузия BDNF в центральную амигдалу нормализует экспрессию Arc, содержание фосфорилированных ERK, Elk и CREB, а также проявляет анксиолитическое действие	[32]
Мыши, C57BL/6J, самцы	3 → 10%-ный раствор, 21 день, постоянный доступ и свободный выбор — 2 поилки	острая отмена	гиппокамп	экспрессия BDNF ↑; фосфорилированные формы ERK, AKT CREB ↑; обучение и память ↓	прямая взаимосвязь с BDNF в отношении экспрессии; системное введение антагониста TrkB ANA-12 нормализует содержание фосфорилированных форм ERK, AKT CREB	[36]
Крысы, Wistar, самцы	5, 10 и 20%-ный раствор, 28 дней, постоянный доступ и свободный выбор — 4 поилки	отсроченная абстиненция (7 дней)	гиппокамп	экспрессия BDNF ↓; фосфорилированная форма ERK2 ↓; память ↓	косвенная взаимосвязь с BDNF	[37]
Крысы, беспородные, самцы	10%-ный раствор, 30 недель, единственный источник жидкости	отсроченная абстиненция (7 дней)	фронтальная кора, гиппокамп	экспрессия BDNF ↑; память ↓	косвенная взаимосвязь с BDNF; введение селанка в период абстиненции увеличивает индекс дискриминации в тесте «узнавание нового объекта» и препятствует этанол-индуцированному повышению уровня BDNF	[38]
Мыши, C57BL/6J, самцы	20%-ный раствор, 21 день, прерывистый доступ и свободный выбор — 2 поилки	ранняя абстиненция (48 часов)	базолатеральная амигдала	частота спонтанных возбуждающих постсинаптических токов ↑; тревожно-подобное поведение ↑	прямая взаимосвязь с BDNF; системное введение миметика BDNF 7,8-дигидрокси-флавона (7,8-ДГФ) ослабляло тревожно-подобное поведение и возбудимость пирамидных нейронов	[45]

Таблица 1 (продолжение)

Вид, линия, пол	Модель потребления алкоголя	Временная точка	Отдел мозга	Показатели	Взаимосвязь с BDNF	Источник
Мыши, C57BL/6J, самцы	3 → 10%-ный раствор, 21 день, постоянный доступ и свободный выбор — 2 поилки	острая отмена	гиппокамп	экспрессия BDNF ↑; нейрогенез ↑	прямая взаимосвязь с BDNF; системное введение антагониста TrkB ANA-12 подавляет нейрогенез	[51]
Крысы, Wistar, самцы	пары этанола, 7 недель, прерывистый доступ	острая отмена (3 часа)	гиппокамп	экспрессия BDNF ↑; фосфорилированная форма TrkB ↑; нейрогенез ↑	косвенная взаимосвязь с BDNF; при отсроченной абстиненции (3 недели) нормализация показателей	[52]
Крысы, Long-Evans, самки	8 г/кг в сутки, 4 дня, интра-гастральная инфузия	ранняя абстиненция (8 часов)	гиппокамп	экспрессия BDNF ↓; нейрогенез ↓	косвенная взаимосвязь с BDNF	[53]
Крысы Sprague-Dawley, самцы	10%-ный раствор, 12 дней, ограниченный доступ (30 минут темная фаза суток), свободный выбор — 2 поилки	отсроченная абстиненция (7 дней)	гиппокамп	экспрессия BDNF ↓; фосфорилированная форма TrkB ↓; нейрогенез ↓; депрессивно-подобное поведение ↑	прямая взаимосвязь с BDNF; системное введение миметика BDNF 7,8-дигидрокси-флавона (7,8-ДГФ) нормализовало экспрессию BDNF и нейрогенез, а также ослабляло депрессивно-подобное поведение	[54]

Примечание. Направление изменений: ↑ — повышение; ↓ — снижение, повышение концентрации этанола от → до.

и нейрогенеза в гиппокампе до контрольных значений [52].

В некоторых работах отмечается специфичность нарушений нейрогенеза в ответ на воздействие алкоголя в зависимости от пола. У самок, но не самцов крыс при ранней абстиненции после интоксикации этанолом с помощью интрагастрального зонда в дозе 8 г/кг в сутки на протяжении 4 дней отмечается снижение числа гранулярных нейронов в зубчатой фасции гиппокампа, а также снижение белка BDNF в дорзальном гиппокампе, что ассоциировано с нарушением пространственной памяти в тесте «водный лабиринт Морриса» [53]. Снижение числа пролиферирующих клеток-предшественников нейронов и незрелых нейронов в зубчатой фасции гиппокампа мышей при отсроченной отмене после потребления алкоголя в течение 28 дней в условиях свободного выбора совпадало с развитием депрессивно-подобного фенотипа [49]. В исследовании

Briones и Woods [54] продемонстрировано, что в основе данного процесса может лежать дефицит гиппокампального BDNF. Так, потребление этанола в режиме свободного выбора, который предоставлялся на протяжении 12 дней на 30 минут в темную фазу суток, сопровождается выраженной ангедонией и развитием депрессивно-подобного поведения, снижением выживаемости и дифференцировки клеток-предшественников нейронов в зубчатой фасции гиппокампа, а также снижением уровня белка BDNF и активной формы TrkB в гиппокампе в период абстиненции [54]. При этом системное введение миметика BDNF (7,8-ДГФ) на протяжении предоставления выбора между раствором этанола и водой, не оказывая влияния на потребление алкоголя, нивелировало нарушения поведения и нейрогенеза, а также нормализовало содержание BDNF и активной формы TrkB в гиппокампе [54].

Таким образом, эксперименты *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что воздействие алкоголя сопровождается нарушением нейропластических процессов. При этом стимуляция сигнальных каскадов, опосредованных BDNF, во всех случаях сопровождается положительным эффектом, нивелирующим установленное нарушение, независимо от того, снижается его уровень в конкретном отделе мозга или повышается в условиях воздействия алкоголя. Данное утверждение также справедливо и для части экспериментов, в которых выявлена феноменологическая взаимосвязь нарушения нейропластичности с изменением содержания BDNF; эти работы демонстрируют корреляционные отношения, в которых повышение уровня BDNF связано с позитивной динамикой в отношении нарушений нейропластичности и наоборот. Данные литературы относительно взаимосвязи BDNF и проявлений нейропластичности в условиях воздействия этанола, полученные в экспериментах на грызунах, суммированы в табл. 1.

КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Анализ экспериментальных данных, полученных в ходе клинических исследований пациентов с патологической зависимостью от алкоголя, показывает потенциальную значимость показателей, характеризующих BDNF как биомаркер течения собственно злоупотребления алкоголем и прогноза восстановления в период воздержания [7, 55, 56]. Фокус исследований, представленных ниже, нацелен на взаимосвязь генетических особенностей строения гена *BDNF* и концентрации периферического BDNF с макроструктурными изменениями в головном мозге, аффективными нарушениями и когнитивным дефицитом в контексте зависимости от алкоголя.

Связь BDNF с морфологическими нарушениями. Наиболее изученным полиморфным локусом гена *BDNF* является rs6265. Данный полиморфизм представляет собой однонуклеотидную замену G → A в транслируемой части гена *BDNF*, что приводит к замене валина на метионин в положении 66 (Val66Met) в про-домене белка. Присутствие аллеля Met снижает секрецию белка при деполяризации нейронов, при этом данный белок отсутствует в секреторных гранулах и синапсах [57]. Согласно данным MPT, здоровые носители аллеля Met характеризуются меньшим объемом и сниженной функциональной активностью гиппокампа и префронталь-

ной коры, а также нарушением формирования памяти [58, 59].

В экспериментальных работах на трансгенных мышах продемонстрирована значимость данного полиморфизма в контексте потребления алкоголя и связанных с этим последствий. Так, трансгенные мыши с гомозиготным генотипом Met68Met (замена Val68Met в гене *Bdnf* мыши эквивалентна замене Val66Met в гене *BDNF* человека) демонстрируют повышенное потребление раствора алкоголя в модели прерывистого доступа в условиях свободного выбора по сравнению с диким типом Val68Val [60]. При этом оверэкспрессия дикого типа BDNF Val68Val в префронтальной коре или системное введение агониста рецепторов TrkB (LM22A-4) снижало потребление алкоголя у данных мышей [60]. С другой стороны, показано, что самки, но не самцы трансгенных мышей, несущих гомозиготный генотип Val66Val гена *BDNF* человека, проявляют большую импульсивность и потребляют больше алкоголя в оперантной модели по сравнению с носителями генотипа Met66Met [61]. Кроме того, трансгенные мыши с гомозиготным генотипом Met68Met, которые пренатально и в раннем постнатальном периоде подвергались действию паров этанола в герметической камере, характеризуются снижением объема слоя пирамидных нейронов в поле гиппокампа CA1 [62]; при этом для данных мышей характерно увеличение объема только субрегиона stratum radiatum поля гиппокампа CA1 [63].

Ряд полиморфных локусов гена *BDNF*, а также периферический уровень BDNF связаны со структурно-функциональными изменениями ЦНС, выявляемыми с помощью MPT у лиц, злоупотребляющих алкоголем. Объем гиппокампа у зависимых от алкоголя пациентов достоверно ниже по сравнению со здоровыми, при этом носительство гомозиготного генотипа Val66Val полиморфизма rs6265 ассоциировано с тенденцией к восстановлению объема гиппокампа в период воздержания на протяжении 7 месяцев [64]. Более того, изменения объема гиппокампа у носителей генотипа Val66Val, но не у носителей аллеля Met, демонстрировали положительные корреляции с выраженностью зрительно-пространственной памяти [64]. Полиморфизм rs6265 связан с региональной спецификой восстановления объема неокортекса во время воздержания от алкоголя. Носители гомозиготного генотипа Val66Val демонстрируют увеличение объема серого вещества в затылочной доле после 5 недель воздержания, тогда как у носителей

гетерозиготного генотипа Val66Met наблюдается увеличение белого вещества в лобной доле и тенденция к увеличению в теменной и височной долях [65]. В подкорковых областях также отмечалась региональная специфика: объём серого вещества в таламусе увеличивался только у носителей гомозигот Val66Val, тогда как общий объём мозжечка и ствола мозга увеличивался только у носителей гетерозигот Val66Met [65]. Кроме того, в общей популяции, включающей как носителей гомозиготного генотипа Val66Val, так и гетерозиготного генотипа Val66Met, изменения корковых и подкорковых объёмов серого вещества образовывали положительные корреляции с восстановлением когнитивных способностей, оценённых с помощью батареи нейрокогнитивных шкал [65]. С другой стороны, полиморфизмы в гене *BDNF* могут быть и не связаны с морфологическими нарушениями в головном мозге. Так, у лиц подросткового возраста с алкогольной зависимостью не было выявлено связи rs6265 и объёма структур ЦНС [66]. Кроме того, у лиц с зависимостью от алкоголя показатели, характеризующие BDNF, могут быть связаны с активностью отделов мозга, что продемонстрировано с помощью функциональной МРТ. Согласно компонентному анализу, набор из 15 полиморфизмов в гене *BDNF*, включая rs6265, и 20 полиморфизмов в гене транскрипционного фактора *CREB* связан со стимул-зависимой гиперактивацией теменной доли и задней поясной извилины у пьющих лиц с наиболее выраженной зависимостью [67]. У лиц с алкогольной зависимостью пониженный уровень BDNF в плазме ассоциирован с нарушением функциональной связи между амигдалой и префронтальной корой [68]. Кроме того, низкий уровень BDNF и сниженная функциональная связь между этими отделами мозга в состоянии тревоги при ожидании шока (пропускание раздражающего электрического тока) связаны с большим количеством эпизодов потребления алкоголя и ранним началом злоупотребления [68].

Связь BDNF с аффективными и когнитивными нарушениями. Структурные изменения в ЦНС, вызванные чрезмерным потреблением алкоголя, сопряжены с развитием тревожности, а также расстройств настроения и когнитивных способностей, при этом данные нарушения могут быть ассоциированы с параметрами, которые характеризуют BDNF.

У лиц с зависимостью от алкоголя в состоянии воздержания (без признаков синдрома отмены) концентрация BDNF в сыворотке крови положительно коррелировала с уровнем

ситуативной тревожности по шкале Спилбергера (STAI, State-Trait Anxiety Inventory) [69]. Примечательно, что взаимосвязь между аффективными расстройствами, показателями, которые характеризуют BDNF, и потреблением алкоголя выявляется даже при отсутствии зависимости. Так, здоровые лица-носители аллеля Met полиморфизма rs6265 без клинически выраженной зависимости от алкоголя являются более тревожными, согласно шкале Либовица, для оценки симптомов социальности (LSAS, Liebowitz Social Anxiety Scale) при стресс-тесте и потребляют больше алкоголя по сравнению с носителями генотипа Val66Val [70].

В период абстиненции (2–4 дня отмены) концентрация BDNF в сыворотке крови у лиц с зависимостью от алкоголя, независимо от коморбидной депрессии, была ниже по сравнению со здоровыми [71]. При этом выявленные отрицательные корреляции между концентрацией BDNF и суммой баллов по шкале оценки ангедонии Снайта–Гамильтона (SHAPS, Snaith–Hamilton Pleasure Scale) свидетельствовали, что чем меньше концентрация BDNF, тем больше выражена ангедония. Согласно результату множественной регрессии, концентрация BDNF совместно с полом и возрастом являются предиктором ангедонии [71]. Показано, что низкий уровень BDNF в сыворотке крови связан со злоупотреблением алкоголем, расстройствами настроения и полиморфизмами в гене *BDNF*. Посредством регрессионного анализа было показано, что 4 фактора, включая уровень γ -глутамилтранспептидазы, носительство Met-аллеля полиморфизма rs6265 в гене *BDNF*, количество предыдущих детоксикаций и эпизодов депрессии (но не коморбидной клинически подтверждённой депрессии) могут предсказать концентрацию BDNF в сыворотке крови как при поступлении в стационар, так и спустя 6 месяцев воздержания [55]. Тем не менее изменения периферического уровня BDNF могут и не ассоциироваться с тревожностью или расстройствами настроения. Так, пониженный уровень BDNF в плазме крови у зависимых от алкоголя пациентов, проходящих терапию, не коррелировал с уровнем ситуативной и личностной тревожности по шкале Спилбергера или выраженностью депрессии по шкале Бека (BDI, Beck's Depression Inventory) [72].

На корейской популяции выявлена положительная корреляция между концентрацией BDNF в плазме крови пациентов с зависимостью от алкоголя, воздерживающихся от алкоголя по меньшей мере неделю, и когнитивными

способностями по шкале CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) [73]. У лиц с алкогольной зависимостью, воздерживающихся от алкоголя по меньшей мере 4 недели, уровень BDNF в плазме понижен по сравнению со здоровым контролем, при этом были выявлены положительные корреляции между уровнем BDNF в плазме крови

и когнитивными способностями, оценёнными с помощью батареи тестов для оценки лобной дисфункции (FAB, frontal assessment battery) [37]. У лиц с зависимостью от алкоголя, не употребляющих алкоголь 4 месяца и демонстрирующих выраженный дефицит когнитивных способностей, установленным на основе батареи тестов FAB и опросника для диагностики

Таблица 2. Взаимосвязь BDNF и клинических последствий зависимости от алкоголя

Потребление алкоголя	Показатель BDNF	Морфологический/клинический показатель	Взаимосвязь с BDNF	Источник
Воздержание, 7 месяцев	Носительство генотипа Val66Val rs6265	объём гиппокампа; зрительно-пространственная память	восстановление объема гиппокампа; положительная корреляция восстановления объема гиппокампа и улучшения зрительно-пространственной памяти	[64]
Воздержание, 5 недель	носительство генотипа Val66Val rs6265	объём серого вещества затылочной доли и таламусе	увеличение объема серого вещества в затылочной доле неокортекса и таламусе	[65]
	носительство генотипа Val66Met rs6265	объём белого вещества лобной доли; общий объем мозжечка и ствола мозга	увеличение объема белого вещества лобной доли неокортекса и общего объема мозжечка и ствола мозга	
Текущая зависимость от алкоголя, воздержание, ≥ 24 часа	концентрация BDNF в плазме	функциональная связь амигидала-медиальная префронтальная кора	пониженный уровень BDNF в плазме крови ассоциирован с нарушением функциональной связи между амигдалой и медиальной префронтальной корой при состоянии тревоги во время ожидания шока (пропускание раздражающего электрического тока) во время процедуры функциональной МРТ; данные показатели связаны с большим количеством эпизодов потребления алкоголя за последние 60 дней и более ранним началом злоупотребления	[68]
Текущая зависимость от алкоголя, без воздержания	концентрация BDNF в сыворотке	тревожность по шкале Спилбергера	установлена положительная корреляция между концентрацией BDNF в сыворотке крови и уровнем ситуативной тревожности по шкале Спилбергера	[69]
Абстиненция, 2–4 дня	концентрация BDNF в сыворотке	ангедония по шкале Снайта–Гамильтона	установлена отрицательная корреляция концентрации BDNF в сыворотке крови и суммы баллов по шкале оценки ангедонии Снайта–Гамильтона; согласно множественной регрессии, концентрация BDNF совместно с полом и возрастом являются предиктором ангедонии	[71]

Таблица 2 (продолжение)

Потребление алкоголя	Показатель BDNF	Морфологический/клинический показатель	Взаимосвязь с BDNF	Источник
Воздержание, 6 месяцев	концентрация BDNF в сыворотке; носительство аллеля Met rs6265	γ-глутамилтранспептидаза в сыворотке; количество детоксикаций и эпизодов депрессии	регрессионный анализ показал, что уровень γ-глутамилтранспептидазы, носительство Met-аллеля полиморфизма rs6265 в гене <i>BDNF</i> ; количество предыдущих детоксикаций и эпизодов депрессии могут предсказать концентрацию BDNF в сыворотке крови как при поступлении в стационар, так и спустя 6 месяцев воздержания	[55]
Воздержание, ≥ 7 дней	концентрация BDNF в плазме	когнитивные способности, CERAD	положительная корреляция между концентрацией BDNF в плазме крови и когнитивными способностями с помощью шкалы CERAD	[73]
Воздержание, ≥ 4 недели	концентрация BDNF в плазме	когнитивные способности, батарея тестов для оценки лобной дисфункции (FAB, frontal assessment battery)	положительные корреляции между уровнем BDNF в плазме крови и когнитивными способностями согласно батарее тестов FAB	[37]
Воздержание, 4 месяца	концентрация BDNF в плазме	когнитивные способности, батарея тестов FAB и MFE (memory failures of everyday)	согласно логистической регрессии, оценка концентрации BDNF в плазме крови может дискриминировать лиц с выраженным дефицитом когнитивных способностей и лиц без дефицита	[74]
Воздержание, 3 недели	концентрация BDNF в сыворотке	когнитивные способности, Монреальская когнитивная шкала	согласно регрессионному анализу, концентрация BDNF в сыворотке крови может быть предиктором когнитивных способностей	[76]

нарушения памяти MFE (memory failures of everyday), концентрация BDNF в плазме крови значительно ниже по сравнению с лицами без дефицита [74]. Согласно логистической регрессии, оценка концентрации BDNF в плазме крови может быть использована для выявления лиц с выраженным дефицитом когнитивных способностей и лиц без дефицита [74]. Было установлено, что у пациентов, зависящих как от кокаина, так и от алкоголя и прошедших курс детоксикации, уровень мРНК *BDNF* в лейкоцитах был повышен, а данный показатель в объединённой популяции может предсказать выраженность когнитивных нарушений по результатам батареи тестов для оценки лобной дисфункции FAB [75]. Спустя 3 недели воздержания в условиях стационара концентрация BDNF в сыворотке крови ассоциирована с суммой баллов по Монреальской когнитивной шкале (MoCA, Montreal Cognitive Assessment) [76]. Тем не менее показатели, ха-

рактеризующие BDNF, могут быть и не связаны с когнитивными способностями в условиях потребления алкоголя. Так, в китайской популяции не было установлено связи между злоупотреблением алкоголя или уровнем BDNF в сыворотке крови с когнитивными способностями, оценёнными с помощью повторяемой батареи для оценки нейропсихологического статуса (RBANS, repeatable battery for the assessment of neuropsychological status) [77].

Таким образом, результаты клинических исследований демонстрируют, что показатели, характеризующие систему BDNF, связаны с последствиями алкогольной зависимости. Так, полиморфизм rs6265 может характеризовать специфику морфологических перестроек в ЦНС, а концентрация BDNF в периферической крови коррелирует с уровнем тревожности и депрессивности, а также выраженностью когнитивных нарушений. Кроме того, полиморфизм rs6265 и концентрация BDNF в

периферической крови могут предсказать динамику таких нарушений. Тем не менее некоторая разнородность данных в настоящее время препятствует однозначному заключению об использовании данных показателей в качестве биомаркеров, прогностических или диагностических критериев. Результаты конкретных клинических исследований представлены в табл. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных позволяет заключить, что при формировании алкогольной зависимости происходят изменения уровня BDNF, по всей видимости, зависящие от структуры ЦНС и способа алкоголизации. Эти изменения могут приводить к специфическим структурным перестройкам нейронов и развитию поведенческих нарушений, тогда как прямое или опосредованное повышение локального уровня BDNF сопровождается обратной динамикой нарушений. В клинике алкогольной зависимости повышение периферического уровня BDNF также в целом связано с благоприятным прогнозом относительно последствий хронической интоксикации в контексте нейропластичности. Тем не менее экспериментальный материал не проясняет, является ли адаптивный процесс структурной и функциональной пластичности, опосредованной BDNF, фактором, который провоцирует развитие зависимости и её последствий, или представляет собой результат реализации компенсаторных механизмов в ответ на хроническое воздействие избыточных концентраций алкоголя [7]. Судя по всему, в зависимости от контекста (отдел мозга, паттерн потребления алкоголя, длительность интоксикации) опосредованная BDNF нейропластичность может являться как патологической, так и адаптивной. Так, основываясь на данных работ под руководством S.C. Pandey [32–35], недостаток BDNF в условиях воздействия алкоголя может являться причиной фенотипического дефицита, тогда как, согласно Stragier et al. [36, 51], повышение уровня BDNF при потреблении алкоголя является звеном компенсаторного механизма, призванного противодействовать нарушениям фенотипа.

Несмотря на определённый прогресс в изучении роли BDNF в нарушении нейропластических процессов, вызванных воздействи-

ем алкоголя, исследования в данной области далеки от завершения. В связи с этим можно выделить актуальные направления будущих исследований.

- Какие нейрохимические системы работают согласовано с BDNF? Поскольку BDNF не является прямой молекулярной мишенью алкоголя [4], необходимо установить механизмы изменения экспрессии BDNF и его функционирования в контексте развития зависимости. Кроме того, важно понять, на какие молекулярные мишени воздействует сам BDNF в условиях воздействия алкоголя.

- Детерминирует ли BDNF чувствительность к действию алкоголя? Склонность к развитию зависимости от алкоголя и связанных с этим адаптивных процессов гетерогенна в популяции. Необходимо установить, какие биологические факторы, связанные напрямую или опосредованно с функционированием BDNF, могут предопределять нарушения нейропластичности при комплексном воздействии алкоголя на ЦНС. Ответ на этот вопрос позволил бы персонализировать профилактику и коррекцию патологического процесса, связанного со злоупотреблением алкоголем.

Представляется, что ответы на эти вопросы в будущем обеспечат внедрение фармакологических и немедикаментозных средств, способных влиять на активность системы BDNF, тем самым нормализуя aberrантную пластичность в уязвимых отделах мозга при зависимости от алкоголя.

Вклад авторов. Д.И. Перегуд — концепция, написание первичного текста; Д.И. Перегуд, В.Ю. Баронец, Н.Н. Теребилина — поиск и анализ данных литературы; Н.В. Гуляева — концепция, окончательное редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение патогенетических механизмов формирования зависимости от психоактивных веществ с использованием генетических, биохимических, иммунологических, нейрофизиологических и нейрокогнитивных подходов» (рег. № 121041300174-8).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киржанова В. В., Григорова Н. И., Бобков Е. Н., Киржанов В. Н., Сидорюк О. В. (2021) *Деятельность наркологической службы в Российской Федерации в 2019-2020 годах: Аналитический обзор*, ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва.
2. Сошников С. С., Стародубов В. И., Халтурина Д. А., Власов В. В., Обухова О. В., Идрисов Б. Т. (2020) Бремя последствий от употребления психоактивных веществ в Российской Федерации, *Неврол. Вестник*, **52**, 49-54, doi: 10.17816/nb18975.
3. Egervari, G., Siciliano, C. A., Whiteley, E. L., and Ron, D. (2021) Alcohol and the brain: from genes to circuits, *Trends Neurosci.*, **44**, 1004-1015, doi: 10.1016/j.tins.2021.09.006.
4. Abrahao, K. P., Salinas, A. G., and Lovinger, D. M. (2017) Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits, *Neuron*, **96**, 1223-1238, doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.032.
5. Gilpin, N. W., and Koob, G. F. (2008) Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms, *Alcohol Res. Health*, **31**, 185-195.
6. Gass, J. T., and Olive, M. F. (2012) Neurochemical and neurostructural plasticity in alcoholism. *ACS Chem. Neurosci.*, **3**, 494-504, doi: 10.1021/cn300013p.
7. Ceballos, N., and Sharma, S. (2016) Risk and resilience: the role of brain-derived neurotrophic factor in alcohol use disorder, *AIMS Neuroscience*, **3**, 398-432, doi: 10.3934/Neuroscience.2016.4.398.
8. Kalueff, A. V. (2007) Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior, *Neural Plast.*, **2007**, 78171, doi: 10.1155/2007/78171.
9. Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N., Monyer, H., and Seeburg, P. H. (2014) Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety, *Nat. Rev. Neurosci.*, **15**, 181-192, doi: 10.1038/nrn3677.
10. Rădulescu, I., Drăgoi, A. M., Trifu, S. C., and Cristea, M. B. (2021) Neuroplasticity and depression: rewiring the brain's networks through pharmacological therapy (review), *Exp. Ther. Med.*, **22**, 1131, doi: 10.3892/etm.2021.10565.
11. Ron, D., and Barak, S. (2016) Molecular mechanisms underlying alcohol-drinking behaviours, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 576-591, doi: 10.1038/nrn.2016.85.
12. Liran, M., Rahamim, N., Ron, D., and Barak, S. (2020) Growth factors and alcohol use disorder, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, **10**, a039271, doi: 10.1101/cshperspect.a039271.
13. Logrip, M. L., Barak, S., Warnault, V., and Ron, D. (2015) Corticostriatal BDNF and alcohol addiction, *Brain Res.*, **1628**, 60-67, doi: 10.1016/j.brainres.2015.03.025.
14. Ron, D., and Berger, A. (2018) Targeting the intracellular signaling "STOP" and "GO" pathways for the treatment of alcohol use disorders, *Psychopharmacology (Berl)*, **235**, 1727-1743, doi: 10.1007/s00213-018-4882-z.
15. Lipsky, R. H., and Marini, A. M. (2007) Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1122**, 130-143, doi: 10.1196/annals.1403.009.
16. Hensler, J. G., Ladenheim, E. E., and Lyons, W. E. (2003) Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT_{1A}) receptor function in heterozygous BDNF^{+/-} mice, *J. Neurochem.*, **85**, 1139-1147, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01748.x.
17. McGough, N. N., He, D. Y., Logrip, M. L., Jeanblanc, J., Phamluong, K., Luong, K., Kharazia, V., Janak, P. H., and Ron, D. (2004) RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction, *J. Neurosci.*, **24**, 10542-10552, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3714-04.2004.
18. Jeanblanc, J., He, D. Y., Carnicella, S., Kharazia, V., Janak, P. H., and Ron, D. (2009) Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking, *J. Neurosci.*, **29**, 13494-13502, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2243-09.2009.
19. Haun, H. L., Griffin, W. C., Lopez, M. F., Solomon, M. G., Mulholland, P. J., Woodward, J. J., McGinty, J. F., Ron, D., and Becker, H. C. (2018) Increasing Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in medial prefrontal cortex selectively reduces excessive drinking in ethanol dependent mice, *Neuropharmacology*, **140**, 35-42, doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.07.031.
20. Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways, *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 299-309, doi: 10.1038/nrn1078.
21. Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., and Blum, R. (2017) Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling, *Pflugers Arch.*, **469**, 593-610, doi: 10.1007/s00424-017-1964-4.
22. Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., and Moryś, J. (2018) BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **38**, 579-593, doi: 10.1007/s10571-017-0510-4.
23. Zagrebelsky, M., Tacke, C., and Korte, M. (2020) BDNF signaling during the lifetime of dendritic spines, *Cell. Tissue Res.*, **382**, 185-199, doi: 10.1007/s00441-020-03226-5.
24. Logrip, M. L., Janak, P. H., and Ron, D. (2008) Dynorphin is a downstream effector of striatal BDNF regulation of ethanol intake, *FASEB J.*, **22**, 2393-2404, doi: 10.1096/fj.07-099135.
25. Ohrtmann, J. D., Stancik, E. K., Lovinger, D. M., and Davis, M. I. (2006) Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor stimulation of extracellular signal-regulated/mitogen-activated protein kinase

- in cerebellar granule cells, *Alcohol*, **39**, 29-37, doi: 10.1016/j.alcohol.2006.06.011.
26. Li, Z., Ding, M., Thiele, C. J., and Luo, J. (2004) Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated intracellular signaling and activator protein-1 activation in cerebellar granule neurons, *Neuroscience*, **126**, 149-162, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.03.028.
 27. Lindsley, T. A., Shah, S. N., and Ruggiero, E. A. (2011) Ethanol alters BDNF-induced Rho GTPase activation in axonal growth cones, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **35**, 1321-1330, doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01468.x.
 28. Gao, X., Smith, G. M., and Chen, J. (2009) Impaired dendritic development and synaptic formation of postnatal-born dentate gyrus granular neurons in the absence of brain-derived neurotrophic factor signaling, *Exp. Neurol.*, **215**, 178-190, doi: 10.1016/j.expneurol.2008.10.009.
 29. Rauskolb, S., Zagrebelsky, M., Dreznjak, A., Deogracias, R., Matsumoto, T., Wiese, S., Erne, B., Sendtner, M., Schaeren-Wiemers, N., Korte, M., and Barde, Y. A. (2010) Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth, *J. Neurosci.*, **30**, 1739-1749, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5100-09.2010.
 30. Rex, C. S., Lin, C. Y., Kramár, E. A., Chen, L. Y., Gall, C. M., and Lynch, G. (2007) Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus, *J. Neurosci.*, **27**, 3017-3029, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4037-06.2007.
 31. Hou, L., Guo, Y., Lian, B., Wang, Y., Li, C., Wang, G., Li, Q., Pang, J., Sun, H., and Sun, L. (2018) Synaptic ultrastructure might be involved in HCN1-related BDNF mRNA in withdrawal-anxiety after ethanol dependence, *Front. Psychiatry*, **9**, 215, doi: 10.3389/fpsyt.2018.00215.
 32. Pandey, S. C., Zhang, H., Ugale, R., Prakash, A., Xu, T., and Misra, K. (2008) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism, *J. Neurosci.*, **28**, 2589-2600, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4752-07.2008.
 33. You, C., Zhang, H., Sakharkar, A. J., Teppen, T., and Pandey, S. C. (2014) Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **17**, 313-322, doi: 10.1017/S1461145713001144.
 34. Moonat, S., Sakharkar, A. J., Zhang, H., and Pandey, S. C. (2011) The role of amygdaloid brain-derived neurotrophic factor, activity-regulated cytoskeleton-associated protein and dendritic spines in anxiety and alcoholism, *Addict. Biol.*, **16**, 238-250, doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00275.x.
 35. Moonat, S., Sakharkar, A. J., Zhang, H., Tang, L., and Pandey, S. C. (2013) Aberrant histone deacetylase2-mediated histone modifications and synaptic plasticity in the amygdala predisposes to anxiety and alcoholism, *Biol. Psychiatry*, **73**, 763-773, doi: 10.1016/j.biopsych.2013.01.012.
 36. Stragier, E., Martin, V., Davenas, E., Poilbout, C., Mongeau, R., Corradetti, R., and Lanfumey, L. (2015) Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice, *Transl. Psychiatry*, **5**, e696, doi: 10.1038/tp.2015.183.
 37. Silva-Peña, D., García-Marchena, N., Alén, F., Araos, P., Rivera, P., Vargas, A., García-Fernández, M. I., Martín-Velasco, A. I., Villanúa, M. Á., Castilla-Ortega, E., Santín, L., Pavón, F. J., Serrano, A., Rubio, G., Rodríguez de Fonseca, F., and Suárez, J. (2019) Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats, *Addict. Biol.*, **24**, 1019-1033, doi: 10.1111/adb.12668.
 38. Kolik, L. G., Nadorova, A. V., Antipova, T. A., Kruglov, S. V., Kudrin, V. S., and Durnev, A. D. (2019) Selank, peptide analogue of tuftsin, protects against ethanol-induced memory impairment by regulating of BDNF content in the hippocampus and prefrontal cortex in rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 641-644, doi: 10.1007/s10517-019-04588-9.
 39. Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., and Varon, S. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport, *J. Neurosci.*, **17**, 2295-2313, doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-07-02295.1997.
 40. Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., Gundelfinger, E. D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., and Barde, Y. A. (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons, *J. Cell. Biol.*, **196**, 775-788, doi: 10.1083/jcb.201201038.
 41. Boulanger, L. M., and Poo, M. M. (1999) Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation, *Nat. Neurosci.*, **4**, 346-351, doi: 10.1038/7258.
 42. Park, H., and Poo, M. M. (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 7-23, doi: 10.1038/nrn3379.
 43. Zucca, S., and Valenzuela, C. F. (2010) Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca^{2+} channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons, *J. Neurosci.*, **30**, 6776-6781, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5405-09.2010.
 44. Kolb, J. E., Trettel, J., and Levine, E. S. (2005) BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol, *Synapse*, **55**, 52-57, doi: 10.1002/syn.20090.
 45. Wang, N., Liu, X., Li, X. T., Li, X. X., Ma, W., Xu, Y. M., Liu, Y., Gao, Q., Yang, T., Wang, H., Peng, Y., Zhu, X. F., and Guan, Y. Z. (2021) 7,8-Dihydroxyflavone alleviates anxiety-like behavior induced by

- chronic alcohol exposure in mice involving tropomyosin-related kinase B in the amygdala, *Mol. Neurobiol.*, **58**, 92-105, doi: 10.1007/s12035-020-02111-0.
46. Peregud, D., Kvichansky, A., Shirobokova, N., Stepanichev, M., and Gulyaeva, N. (2022) 7,8-DHF enhances SHH in the hippocampus and striatum during early abstinence but has minor effects on alcohol intake in IA2BC paradigm and abstinence-related anxiety-like behavior in rats, *Neurosci. Lett.*, **781**, 136671, doi: 10.1016/j.neulet.2022.136671.
 47. Aberg, E., Hofstetter, C. P., Olson, L., and Brené, S. (2005) Moderate ethanol consumption increases hippocampal cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **8**, 557-567, doi: 10.1017/S1461145705005286.
 48. Nixon, K., and Crews, F. T. (2002) Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus, *J. Neurochem.*, **83**, 1087-1093, doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01214.x.
 49. Stevenson, J. R., Schroeder, J. P., Nixon, K., Besheer, J., Crews, F. T., and Hodge, C. W. (2009) Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice, *Neuropsychopharmacology*, **34**, 1209-1222, doi: 10.1038/npp.2008.90.
 50. Numakawa, T., Odaka, H., and Adachi, N. (2018) Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3650, doi: 10.3390/ijms19113650.
 51. Stragier, E., Massart, R., Salery, M., Hamon, M., Geny, D., Martin, V., Boulle, F., and Lanfumey, L. (2015) Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice, *Mol. Psychiatry*, **20**, 405-412, doi: 10.1038/mp.2014.38.
 52. Somkuwar, S. S., Fannon, M. J., Staples, M. C., Zamora-Martinez, E. R., Navarro, A. I., Kim, A., Quigley, J. A., Edwards, S., and Mandyam, C. D. (2016) Alcohol dependence-induced regulation of the proliferation and survival of adult brain progenitors is associated with altered BDNF-TrkB signaling, *Brain. Struct. Funct.*, **221**, 4319-4335, doi: 10.1007/s00429-015-1163-z.
 53. Maynard, M. E., Barton, E. A., Robinson, C. R., Wooden, J. I., and Leasure, J. L. (2018) Sex differences in hippocampal damage, cognitive impairment, and trophic factor expression in an animal model of an alcohol use disorder, *Brain. Struct. Funct.*, **223**, 195-210, doi: 10.1007/s00429-017-1482-3.
 54. Briones, T. L., and Woods, J. (2013) Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis, *Neuroscience*, **254**, 324-334, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.031.
 55. Nubukpo, P., Ramoz, N., Girard, M., Malauzat, D., and Gorwood, P. (2017) Determinants of blood brain-derived neurotrophic factor blood levels in patients with alcohol use disorder, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **41**, 1280-1287, doi: 10.1111/acer.13414.
 56. Kethawath, S. M., Jain, R., Dhawan, A., and Sarkar, S. (2020) A review of peripheral brain-derived neurotrophic factor levels in alcohol-dependent patients: current understanding, *Indian J. Psychiatry*, **62**, 15-20, doi: 10.4103/psychiatry.IndianJPsychiatry_134_19.
 57. Egan, M. F., Kojima, M., Callicott, J. H., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., and Weinberger, D. R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function, *Cell*, **112**, 257-269, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00035-7.
 58. Hariri, A. R., Goldberg, T. E., Mattay, V. S., Kolachana, B. S., Callicott, J. H., Egan, M. F., and Weinberger, D. R. (2003) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance, *J. Neurosci.*, **23**, 6690-6694, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-17-06690.2003.
 59. Pezawas, L., Verchinski, B. A., Mattay, V. S., Callicott, J. H., Kolachana, B. S., Straub, R. E., Egan, M. F., Meyer-Lindenberg, A., and Weinberger, D. R. (2004) The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology, *J. Neurosci.*, **24**, 10099-10102, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2680-04.2004.
 60. Warnault, V., Darq, E., Morisot, N., Phamluong, K., Wilbrecht, L., Massa, S. M., Longo, F. M., and Ron, D. (2016) The BDNF valine 68 to methionine polymorphism increases compulsive alcohol drinking in mice that is reversed by tropomyosin receptor kinase B activation, *Biol. Psychiatry*, **79**, 463-473, doi: 10.1016/j.biopsych.2015.06.007.
 61. Hogan, N. L., Jaehne, E. J., Bak, S., Djouma, E., and van den Buuse, M. (2021) Brain-Derived neurotrophic factor Val66Met induces female-specific changes in impulsive behaviour and alcohol self-administration in mice, *Behav. Brain Res.*, **401**, 113090, doi: 10.1016/j.bbr.2020.113090.
 62. Bird, C. W., Baculis, B. C., Mayfield, J. J., Chavez, G. J., Ontiveros, T., Paine, D. J., Marks, A. J., Gonzales, A. L., Ron, D., and Valenzuela, C. F. (2019) The brain-derived neurotrophic factor VAL68MET polymorphism modulates how developmental ethanol exposure impacts the hippocampus, *Genes Brain Behav.*, **18**, e12484, doi: 10.1111/gbb.12484.
 63. Bird, C. W., Barber, M. J., Martin, J., Mayfield, J. J., and Valenzuela, C. F. (2020) The mouse-equivalent of the human BDNF VAL66MET polymorphism increases dorsal hippocampal volume and does not interact with developmental ethanol exposure, *Alcohol*, **86**, 17-24, doi: 10.1016/j.alcohol.2020.03.005.
 64. Hoefer, M. E., Pennington, D. L., Durazzo, T. C., Mon, A., Abé, C., Truran, D., Hutchison, K. E., and Meyerhoff, D. J. (2014) Genetic and behavioral

- determinants of hippocampal volume recovery during abstinence from alcohol, *Alcohol*, **48**, 631-638, doi: 10.1016/j.alcohol.2014.08.007.
65. Mon, A., Durazzo, T. C., Gazdzinski, S., Hutchison, K. E., Pennington, D., and Meyerhoff, D. J. (2013) Brain-derived neurotrophic factor genotype is associated with brain gray and white matter tissue volumes recovery in abstinent alcohol-dependent individuals, *Genes Brain Behav.*, **12**, 98-107, doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00854.x.
 66. Dalvie, S., Stein, D. J., Koenen, K., Cardenas, V., Cuzen, N. L., Ramesar, R., Fein, G., and Brooks, S. J. (2014) The BDNF p.Val66Met polymorphism, childhood trauma, and brain volumes in adolescents with alcohol abuse, *BMC Psychiatry*, **14**, 328, doi: 10.1186/s12888-014-0328-2.
 67. Chen, J., Hutchison, K. E., Calhoun, V. D., Claus, E. D., Turner, J. A., Sui, J., and Liu, J. (2015) CREB-BDNF pathway influences alcohol cue-elicited activation in drinkers, *Hum. Brain Mapp.*, **36**, 3007-3019, doi: 10.1002/hbm.22824.
 68. Gorka, S. M., Teppen, T., Radoman, M., Phan, K. L., and Pandey, S. C. (2020) Human plasma BDNF is associated with amygdala-prefrontal cortex functional connectivity and problem drinking behaviors, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **23**, 1-11, doi: 10.1093/ijnp/pyz057.
 69. Portelli, J., Farokhnia, M., Deschaine, S. L., Battista, J. T., Lee, M. R., Li, X., Ron, D., and Leggio, L. (2020) Investigating the link between serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor and behavioral measures in anxious alcohol-dependent individuals, *Alcohol*, **89**, 75-83, doi: 10.1016/j.alcohol.2020.07.009.
 70. Colzato, L. S., Van der Does, A. J., Kouwenhoven, C., Elzinga, B. M., and Hommel, B. (2011) BDNF Val66Met polymorphism is associated with higher anticipatory cortisol stress response, anxiety, and alcohol consumption in healthy adults, *Psychoneuroendocrinology*, **36**, 1562-1569, doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.04.010.
 71. Levchuk, L. A., Meeder, E. M. G., Roschina, O. V., Loonen, A. J. M., Boiko, A. S., Michalitskaya, E. V., Epimakhova, E. V., Losenkov, I. S., Simutkin, G. G., Bokhan, N. A., Schellekens, A. F. A., and Ivanova, S. A. (2020) Exploring brain derived neurotrophic factor and cell adhesion molecules as biomarkers for the transdiagnostic symptom anhedonia in alcohol use disorder and comorbid depression, *Front. Psychiatry*, **11**, 296, doi: 10.3389/fpsyt.2020.00296.
 72. Joe, K. H., Kim, Y. K., Kim, T. S., Roh, S. W., Choi, S. W., Kim, Y. B., Lee, H. J., and Kim, D. J. (2007) Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **31**, 1833-1838, doi: 10.1111/j.1530-0277.2007.00507.x.
 73. Han, C., Bae, H., Won, S. D., Roh, S., and Kim, D. J. (2015) The relationship between brain-derived neurotrophic factor and cognitive functions in alcohol-dependent patients: a preliminary study, *Ann. Gen. Psychiatry*, **14**, 30, doi: 10.1186/s12991-015-0065-z.
 74. Requena-Ocaña, N., Araos, P., Flores, M., García-Marchena, N., Silva-Peña, D., Aranda, J., Rivera, P., Ruiz, J. J., Serrano, A., Pavón, F. J., Suárez, J., and Rodríguez de Fonseca, F. (2021) Evaluation of neurotrophic factors and education level as predictors of cognitive decline in alcohol use disorder, *Sci. Rep.*, **11**, 15583, doi: 10.1038/s41598-021-95131-2.
 75. Anders, Q. S., Ferreira, L. V. B., Rodrigues, L. C. M., and Nakamura-Palacios, E. M. (2020) BDNF mRNA expression in leukocytes and frontal cortex function in drug use disorder, *Front. Psychiatry*, **11**, 469, doi: 10.3389/fpsyt.2020.00469.
 76. Перегуд Д. И., Корольков А. И., Баронец В. Ю., Лобачева А. С., Аркус М. Л., Игумнов С. А., Пирожков С. В., Теребилина Н. Н. (2022) Уровень BDNF, miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови в динамике синдрома отмены алкоголя, *Биомед. Химия*, **68**, 218-227, doi: 10.18097/PBMC20226803218.
 77. Zhang, X. Y., Tan, Y. L., Chen, D. C., Tan, S. P., Yang, F. D., Zunta-Soares, G. B., and Soares, J. C. (2016) Effects of cigarette smoking and alcohol use on neurocognition and BDNF levels in a Chinese population, *Psychopharmacology (Berl)*, **233**, 435-445, doi: 10.1007/s00213-015-4124-6.

ROLE OF BDNF IN NEUROPLASTICITY ASSOCIATED WITH ALCOHOL DEPENDENCE

Review

D. I. Peregud^{1,2*}, V. Yu. Baronets¹, N. N. Terebilina¹, and N. V. Gulyaeva^{2,3}

¹ Federal State Budgetary Institution, "V. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Drug Addiction" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119002 Moscow, Russia; e-mail: peregud_d@yahoo.com

² *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia*

³ *Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department,
115419 Moscow, Russia*

Chronic alcohol consumption is characterized by disturbances of neuroplasticity. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) may mechanistically participate in this process. Here we aimed to review actual experimental and clinical data related to BDNF involvement in neuroplasticity in the context of alcohol dependence. As shown in experiments on the rodents alcohol consumption is accompanied brain region-specific changes of BDNF expression and by structural and behavioral impairments. BDNF reverses aberrant neuroplasticity during alcohol intoxication. According to clinical data indices characterized BDNF demonstrate close relationship with consequences of alcohol dependence. Polymorphism rs6265 within BDNF gene interacts with macrostructural changes in the brain, while peripheral BDNF concentration may reflect anxiety, depression and cognitive decline. Thus, BDNF is involved in mechanisms of alcohol-related aberrant neuroplasticity, while polymorphisms within BDNF gene and peripheral BDNF concentration may be biomarkers, diagnostic or prognostic factors in clinics of alcoholism.

Keywords: BDNF, neuroplasticity, alcohol, dependence

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АРХИТЕКТУРА БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Обзор

© 2023 М.И. Шадрина*, П.А. Сломинский

ФГБУ Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: shadrina@img.ras.ru

Поступила в редакцию 02.11.2022

После доработки 25.01.2023

Принята к публикации 25.01.2023

В 2022 году исполняется 25 лет с того момента, когда была идентифицирована первая мутация при семейной аутосомно-доминантной форме болезни Паркинсона. За эти годы наши представления о роли генетических факторов в патогенезе семейной и идиопатической форм болезни Паркинсона существенно расширились – был выявлен ряд генов семейной формы заболевания, выявлены ДНК-маркеры повышенного риска развития спорадической формы заболевания. Но, несмотря на все достигнутые успехи, мы далеки от точной оценки вклада в развитие заболевания как генетических факторов, так и тем более факторов эпигенетических. В обзоре суммирована накопленная к настоящему времени информация о генетической архитектуре болезни Паркинсона и сформулированы вопросы, требующие решения и связанные в первую очередь с оценкой эпигенетических факторов в патогенезе заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Болезнь Паркинсона, моногенная форма, спорадическая форма, генетика, анализ мутаций, полногеномный ассоциативный анализ, эпигенетика, генетический риск.

DOI: 10.31857/S0320972523030107, **EDN:** QXIEYO

ВВЕДЕНИЕ.

БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА: КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА И ПАТОГЕНЕЗ

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное неуклонно прогрессирующее заболевание, которое характеризуется в первую очередь тетрадой моторных нарушений – таких как тремор (в первую очередь рук), мышечная ригидность, брадикинезия и постуральная неустойчивость. По частоте встречаемости среди нейродегенеративных заболеваний БП уступает только болезни Альцгеймера, и в возрасте более 80 лет симптомы паркинсонизма наблюдаются как минимум у 2% населения в разных странах мира [1]. Принято выделять семейную и спорадическую (или идиопатическую) формы БП, причем фенотипически эти формы практически не различимы. Семейные формы составляют от 5 до 10% всех случаев заболевания, но эта оценка может быть занижена,

и при учете некоторых особенностей наследования доля таких форм может достигать 20%.

В основе развития моторных нарушений при БП лежит избирательная гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции (substantia nigra pars compacta) со значительным снижением уровня дофамина в стриатуме. Это приводит к нарушению нормального функционирования базальных ядер головного мозга с нарушением контроля за моторным поведением. Процессу нейрональной гибели в большинстве случаев предшествует появление так называемых телец Леви и нейритов Леви – цитоплазматических включений, состоящих в первую очередь из фибриллярного альфа-синуклеина, убиквитина, миелин-ассоциированного белка тау и ряда других белков. Необходимо отметить, что тельца и нейриты Леви выявляют и в других структурах мозга (дорзальном моторном ядре, таламусе, миндалевидном теле, ядре шва, обонятельных

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; CNV – варианты числа копий ДНК; GWAS – полногеномные ассоциативные исследования.

* Адресат для корреспонденции.

луковицах, коре больших полушарий), и в связи с этим БП не следует рассматривать как заболевание, ограниченное только одним типом нейронов и несколькими структурами мозга [2, 3]. Включения по типу телец Леви найдены и в периферической нервной системе, в частности, в нейронах подслизистой оболочки кишечника. Вероятно, что эти включения могут образовываться на первом этапе развития патологического процесса в различных отделах нервной системы и постепенно распространяться на другие отделы мозга. Именно это лежит в основе неуклонного прогрессирования заболевания. Причем на первых его стадиях оно не затрагивает дофаминергическую систему черной субстанции и стриатума с нарушением моторного поведения. На продромальной стадии заболевания наблюдаются нарушения сна и обоняния, дисфункция кишечника и мочеполовой системы, но эти изменения не специфичны и не могут служить критериями диагностики БП. Моторные же нарушения наблюдаются при гибели значительной части дофаминергических нейронов черной субстанции (не менее 50%) и снижении уровня дофамина в стриатуме на 70–80% [4]. На компенсацию снижения уровня дофамина в стриатуме направлены основные методы терапии заболевания и в первую очередь терапия предшественником дофамина — леводопой. Кроме этого, на первых этапах лечения могут использоваться агонисты дофамина или ингибиторы моноаминоксидазы В или катехол-О-метилтрансферазы. На поздних стадиях используют ряд препаратов, направленных на блокирование побочных эффектов леводопы, таких как амантадин при дискинезиях или апоморфин — при развитии навязчивых состояний. Но в любом случае терапия является симптоматической и не направлена на модификацию причин развития нейродегенерации [5].

МОНОГЕННЫЕ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Впервые точная генетическая природа семейной формы БП была показана в 1997 г., когда была выявлена миссенс-мутация p.Ala30Thr в гене альфа-синуклеина *SNCA* в большой немецкой семье с аутосомно-доминантным наследованием БП в четырех поколениях и в трех неродственных греческих семьях, где заболевание наблюдалось в двух и трех поколениях [6]. Позднее в этом гене было идентифицировано еще несколько патогенетически значимых миссенс-мутаций (p.Ala30Pro,

p.Glu46Lys, p.Gly51Asp, p.Ala53Glu, p.Ala53Thr), и было показано, что к развитию заболевания могут приводить мутации с изменением дозы гена (дупликации, трипликации, квадрупликации) без каких-либо нарушений структуры белка [7]. Частота встречаемости мутаций в этом гене невелика. Мутации выявлены у примерно 0,2% и 1–2% пациентов со спорадической и семейной формами заболевания соответственно, но они играют роль связующего звена между этими формами заболевания и указывают на принципиально важную роль нарушений структуры и функции альфа-синуклеина в патогенезе заболевания [8].

Число идентифицированных генов семейной формы БП неуклонно росло, и к настоящему времени выявлено более 10 генов, мутации в которых однозначно ведут к менделирующей БП. В табл. 1 приведено краткое описание генов с наиболее строго доказанной и не однократно подтвержденной в различных исследованиях патогенетической ролью. Но необходимо подчеркнуть, что дискуссия о роли этих и ряда других генов в этиопатогенезе БП продолжается.

Один из наиболее ярких примеров такой дискуссии — переоценка роли гена убиквитин карбоксигидролазы *UCHL1* (*PARK5*) (не включенного нами в табл. 1) в патогенезе БП. Впервые мутации в этом гене были выявлены в 1998 г., когда в семье из Германии с поздним развитием заболевания была выявлена косегрегирующая с ним миссенс-мутация p.Ile193Met [9]. Однако с тех пор не удалось выявить ни одного семейного случая БП, связанного с мутацией в гене *UCHL1* [10, 11].

В то же время был выявлен ряд полиморфных вариантов гена *UCHL1*, один из которых (миссенс-вариант p.Ser18Tyr) активно изучался у спорадических пациентов с БП. Эти ассоциативные исследования давали противоречивые результаты, но проведенный метаанализ выборки размером более 6500 пациентов не выявил какой-либо ассоциации этого полиморфизма с развитием заболевания при использовании доминантной, рецессивной и аддитивной моделей [12]. Необходимо подчеркнуть, что данный метаанализ был проведен в первую очередь у пациентов-европеоидов и позднее были получены данные о возможной роли данного полиморфизма в развитии БП в японской популяции [13], но и в этом случае проведенный позднее метаанализ также исключил влияние полиморфизма p.Ser18Tyr на риск развития заболевания у азиатских популяций [14] как в выборке в целом, так и в селектированных по этничности подвыборках.

Таблица 1. Основные гены семейных форм БП с доказанным менделирующим наследованием

Ген	Год	Наследование	Тип мутаций	Частота при семейных формах	Ассоциация при GWAS	Нормальная функция	Механизм патогенеза	Ссылка
<i>SNCA</i>	1997, 2003	доминантное	миссенс-мутации, дупликации, трипликации	очень низкая	да	регуляция транспорта синаптических везикул в пресинаптической области через SNARE комплекс	образование агрегатов фибриллярного синуклеина	[3]
<i>PRKN</i>	1998	рецессивное	миссенс-мутации, частичные делеции и дупликации	низкая	нет	убиквитин протеин лигаза, контролирующая митофагию в нейрональных клетках	потеря функции	[99]
<i>DJ1</i>	2003	рецессивное	миссенс-мутации	очень низкая	нет	защита митохондрий от оксидантного стресса	потеря функции	[100]
<i>LRRK2</i>	2004	доминантное	миссенс-мутации	высокая	да	мультифункциональная ГТФаза и киназа, принимающая участие в различных клеточных процессах	новая функция	[101]
<i>PINK1</i>	2004	рецессивное	миссенс-мутации или делеции	низкая	нет	протеин киназа, контролирующая состояние митохондрий	потеря функции	[102]
<i>POLG</i>	2004	доминантное	миссенс-мутации или делеции	очень низкая	нет	каталитическая субъединица митохондриальной ДНК полимеразы, целостность митохондриального генома	потеря функции	[103]
<i>ATP13A2</i>	2006	рецессивное	миссенс-мутации или делеции	низкая	нет	транспорт полиаминов в лизосомах, связаны с аутофагией лизосом	потеря функции	[104]
<i>FBXO7</i>	2008	рецессивное	миссенс-мутации	очень низкая	нет	субстрат рекрутирующий адапторный белок, участвующий в образовании мультимерного комплекса E3 убиквитин лигазы	потеря функции	[105, 106]
<i>PLA2G6</i>	2009	рецессивное	миссенс-мутации или делеция	низкая	нет	фосфолипаза, играющая важную роль в гомеостазе клеточных мембран, ремоделировании глицериновых фосфолипидов и контроле за перекисным окислением жирных кислот	потеря функции	[106, 107]
<i>VPS35</i>	2011	доминантное	миссенс-мутации или делеции	очень низкая	нет	белок VPS35 регулирует регенерацию и эндолитоз синаптических везикул	дисфункция Rab опосредованного пути эндолитоза	[108]
<i>DNAJC13</i>	2012	рецессивное	миссенс-мутации или делеции	очень низкая	нет	регуляция транспорта клатрина в биогенезе ранних эндосом	потеря функции	[109]
<i>SYNJ1</i>	2013	рецессивное	миссенс-мутации или делеции	очень низкая	нет	транспорт эндосом и рециклинг синаптических везикул	потеря функции	[110]
<i>VPS13C</i>	2016	доминантное	миссенс-мутации или делеции	очень низкая	нет	участие в процессах Pink1/Parkin-опосредованной митофагии	потеря функции	[111]

Примечание. Год — год описания первой патогенетически значимой мутации.

Анализ трансгенных мышей с мутациями в гене белка убиквитин карбоксигидролазы дал противоречивые результаты. Так, у мышей с внутригенной делецией в гомологе гена *UCHL1* наблюдалось снижение уровня моноубиквитина с образованием *in vivo* белковых включений, но без признаков нейродегенерации в области черной субстанции [15]. В то же время у трансгенных мышей с мутантным геном *UCHL1* p.193Met в возрасте 20 месяцев была выявлена нейродегенерация в области черной субстанции с нарушением спонтанной двигательной активности [16], которая сопровождалась образованием белковых включений и нарушением обмена альфа-синуклеина [17]. В случае полиморфизма p.Ser18Tyr вариант 18Tyr, в отличие от белка дикого типа, обладает антиоксидантной активностью как *in vitro* в культурах нейрональных клеток, так и *in vivo* при введении трансгена в область черной субстанции [18, 19], что может снижать риск развития процессов нейродегенерации у носителей варианта 18Tyr.

В итоге совокупность генетических и молекулярно-биологических данных не позволяет однозначно решить вопрос о роли гена *UCHL1* в патогенезе БП, хотя пока позиция «против» кажется более аргументированной.

Второй не включенный в табл. 1 ген — ген глюкоцереброзидазы *GBA*. Мутации в гене этой лизосомальной гидролазы были впервые описаны при болезни Гоше — системном заболевании с нарушением кроветворения и повышенным риском переломов и разной степенью выраженности неврологических нарушений. В настоящее время в гене *GBA* описано более 300 патогенетически значимых мутаций, и в данном случае нет никаких сомнений в том, что мутации в этом гене играют важную роль в развитии БП как в гетерозиготном, так и в гомозиготном или компаундно-гетерозиготном состояниях [20–23].

Но проблема состоит в том, что даже у гомозигот по мутациям в гене глюкоцереброзидазы *GBA* симптоматика паркинсонизма развивается только у части носителей мутаций и независимо от наличия клинического фенотипа болезни Гоше. Так, у гомозигот по частой и относительно мягкой мутации Asn370Ser (ведущей к болезни Гоше типа 1 без выраженных неврологических нарушений) паркинсонизм развивается только у примерно 9% лиц с таким генотипом [20]. Компаундные гетерозиготы по этой мутации выявлены у примерно 40% пациентов с болезнью Гоше и паркинсонизмом — таким образом, суммарно она выявляется у 49% пациентов с данным фенотипом.

Повышенный риск развития БП выявлен и у гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA* — развитие заболевания выявлено у примерно 10% носителей мутаций, а пенетрантность этих мутаций оценивается в 30% в возрасте 80 лет [23, 24]. Наиболее вероятно, что все вызывающие болезнь Гоше мутации повышают риск развития БП, причем вероятность развития паркинсонизма коррелирует с тяжестью клинической картины болезни Гоше, наблюдаемой у носителей этих мутаций. К настоящему времени у больных БП выявлено более 130 патогенетически значимых мутаций в гене *GBA*, причем в различных этнических группах преобладают разные мутации. Так, у евреев-ашкеназов БП связана в основном с мутациями p.Arg496His, p.Asn370Ser и 84insGC, а у европеоидов — с мутациями p.Asn370Ser, p.Leu444Pro, p.Arg120Trp, IVS2 + 1G > A, p.His255Gln, p.Asp409His, p.Glu326Lys, p.Thr369Met. В разных популяциях также отличается частота встречаемости мутантных вариантов гена *GBA*, что может влиять на оценку кумулятивного риска развития *GBA*-ассоциированной БП в разных этнических группах. Но в любом случае мутации в гене *GBA* повышают риск развития заболевания с очень далекой от 100% пенетрантностью.

Сниженная пенетрантность наблюдается и в случае мутаций в гене киназы 2 с лейцин-богатыми повторами (*LRRK2* или дардарина). Ген *LRRK2* исторически рассматривается как ген аутосомно-доминантной формы заболевания с пенетрантностью, близкой к 100%. Однако из более чем 100 описанных мутаций в этом гене только для 6 (p.Gly2019Ser, p.Arg1441Cys/Gly/His, Tyr1699Cys, Ile2020Thr) описана четкая семейная косегрегация заболевания. Однако и в этом случае пенетрантность мутаций не достигает 100% [25]. Для мутации p.Gly2019Ser она достигает 85% в возрасте 80 лет [26], причем ее величина отличается в разных этнических группах. Еще более низкой оказалась пенетрантность для мутаций в кодоне 1441 [27], причем она отличалась для разных миссенс-вариантов этой мутации. Точно количественно оценить пенетрантность четырех остальных мутаций не удалось в связи с их низкой частотой, но и в этом случае очевидно, что она не является полной.

Таким образом, выявление в гене *LRRK2* мутаций с патогенетически доказанной значимостью указывает на повышенный риск развития БП. Но точная оценка этого риска на основании только факта выявления мутации невозможна. Это в целом затрудняет оценку вклада мутаций в этом гене в риск развития

именно семейных форм БП, и имеющиеся в литературе оценки (согласно которым мутации в гене *LRRK2* находят у 5% пациентов с семейными формами заболевания и у 1% больных с идиопатической БП) следует рассматривать как ориентировочные [28].

Крайне интересна ситуация с геном паркина *PRKN*. Диаллельные мутации в этом гене с потерей функции в гомозиготном или компаундном гетерозиготном состоянии ведут к развитию аутосомно-рецессивной ювенильной формы БП, для которой характерен медианный возраст клинического дебюта в 31 год, причем у 16% пациентов первые признаки заболевания наблюдаются в возрасте до 20 лет [29]. В целом считается, что от 10 до 20% пациентов с возрастом дебюта до 40 лет являются носителями диаллельных мутаций в гене *PRKN*, хотя данные по разным популяциям достаточно сильно отличаются [30–32]. Подавляющую часть этих мутаций составляют возникшие в результате неравного гомологичного кроссинговера большие делеции/дупликации, захватывающие несколько экзонов гена *PRKN* и приводящие к сдвигу рамки считывания с образованием нефункционального варианта белка паркина. Однако оказалось, что такие мутации в гетерозиготном состоянии обнаруживаются у пациентов со спорадической формой БП [33–35]. Эти делеции/дупликации также были выявлены и при популяционных исследованиях здоровых лиц у примерно 5% обследованных [36] — то есть их частота превышает популяционную частоту мутаций в гене дардарина. В связи с этим их можно рассматривать как аутосомно-доминантные, приводящие к форме БП с классическим дебютом в возрасте более 55–60 лет, или как фактор риска развития заболевания (по аналогии с мутациями в гене *GBA*). Потенциальная патогенетическая роль этих мутаций в гетерозиготном состоянии была подтверждена при анализе функциональной активности нигростриатной системы головного мозга использованием флюоро-ДОФА [37]. У гетерозиготных носителей мутаций было выявлено снижение уровня дофамина в хвостатом ядре и скорлупе, которое, однако, менее выражено, чем у пациентов с идиопатической болезнью Паркинсона. Такое снижение уровня дофамина вызывает компенсаторную активацию активности в области правой дорзальной премоторной коры и ростральной дополнительной моторной области [37, 38], что замедляет развитие моторных нарушений у гетерозиготных носителей мутаций в гене паркина на фоне нарушения обмена дофамина. Аналогичная картина наблюдается

и у гетерозиготных носителей мутаций в гене *PINK1*, но в обоих случаях до настоящего времени не проведено проспективных исследований для оценки развития БП у носителей гетерозиготных мутаций [39]. С другой стороны, не было выявлено статистически достоверных отличий в частоте гетерозиготных делеций гена паркина при CNV-анализе больших (более 2000 человек) выборок пациентов с БП и здоровых лиц [40].

В целом считается, что моногенные формы БП наблюдаются у 5–10% пациентов [41]. При этом основной вклад в развитие соответственно аутосомно-доминантных и аутосомно-рецессивных моногенных форм вносят гены *LRRK2* и *PRKN*. Необходимо подчеркнуть, что опубликовано крайне мало работ с широкомасштабным анализом большого числа генов. Так, в Бразилии был проведен метаанализ ряда выполненных в этой стране исследований, охватывающих все основные гены БП. В итоге оказалось, что в не селектированной по семейному характеру заболевания выборке самыми частыми оказались точковые мутации в гене *LRRK2* (выявлена у 2,5% пациентов, причем в 2,2% случаев найдена мутация p.Gly2019Ser). Мутации в гене паркина выявлены у 8,3% пациентов. В Ирландии анализ был ограничен только мутациями в генах *PRKN*, *DJ1*, *PINK1* и пациентами с ранним возрастом клинического дебюта, и были выявлены только мутации в гене *PRKN* у 6,9% обследованных больных. Анализ тех же трех генов был проведен у пациентов с EOPD из Центральной Европы (в основном из Польши), мутации в гене *PRKN* были обнаружены у 3,1% пациентов [30, 31, 42]. Часто мутационный скрининг ограничивается только мутацией p.Gly2019Ser — она изучена в большом числе популяций мира, и в большинстве из них ее частота как при семейных, так и спорадических случаях заболевания не превышает 3–5% [43].

Все это говорит о низкой частоте патогенетически значимых мутаций в мажорных генах семейных форм заболевания, выраженной межпопуляционной гетерогенности и необходимости продолжения работ как по анализу спектра мутаций при БП с включением в исследование более широкой панели генов, так и по поиску новых генов моногенных форм заболевания [44, 45]. Ряд авторов предлагает свои варианты панели генов семейных форм заболевания, но эти панели достаточно сильно отличаются (рисунок). В итоге имеющейся в настоящее время информации оказывается крайне недостаточно для внедрения в практику алгоритмов генетического тестирования риска развития БП. Разработан ряд сильно



Отсутствие полного консенсуса по генам моногенных форм болезни Паркинсона. По периферии в голубых блоках — предложенные разными авторами гены моногенных форм [7, 41, 47, 48]. В центральном блоке красным выделены гены, упомянутые в каждом из списков, а зеленым — упомянутые как минимум дважды

отличающихся по числу и набору генов коммерческих панелей для такого тестирования, но ни одна из них не обладает, по мнению экспертов, достаточной информативностью без включения в анализ дополнительных данных, описывающих семейный анамнез и фенотипические особенности тестируемого. При этом минимальная панель из пяти общих для всех панелей генов (*PRKN, LRRK2, SNCA, PINK1, PARK7*) по своей эффективности практически не отличается от максимальной панели из 43 генов [46].

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АССОЦИАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Очевидная важная роль генетических факторов в патогенезе БП и сочетание семейных и идиопатических форм заболевания при явном преобладании последних стали основой для проведения полногеномных ассоциативных исследований или GWAS при идиопатической форме заболевания. Первые такие исследования были проведены в 2005–2006 гг. на относительно небольших по численности

выборках и с использованием ограниченного набора ДНК-маркеров и не дали каких-либо высоко достоверных результатов [49, 50], и, по сути, оказались пробой пера, направленной на отработку технологии проведения GWAS при нейродегенеративных заболеваниях. Такой же пробой пера стал и первый метаанализ данных GWAS, в рамках которого был проведен совместный анализ двух ранее упомянутых работ [51]. Этот анализ позволил выявить три однонуклеотидных ДНК-маркера, ассоциированных с развитием заболевания вне зависимости от используемой стратегии метаанализа, но ни один из них не достигал уровня полногеномной значимости ($p < 5 \cdot 10^{-8}$). При этом стало очевидно, что повышение информативности возможно при значительном увеличении размеров анализируемых выборок (с переходом от сотен человек в GWAS-исследованиях 2005–2006 гг. к десяткам тысяч — в более поздних работах) и повышении плотности анализируемых ДНК-маркеров.

Сочетание технологического развития методологии GWAS (повышение информативности микрочипов, усовершенствование методов статистического анализа) привело к тому, что в настоящее время проведено генотипирование

десятков тысяч пациентов с БП и выполнен ассоциативный анализ как для самого заболевания, так и для его эндотипов (возраст клинического дебюта, характер моторных нарушений, наличие сопутствующих психоэмоциональных расстройств, скорость прогрессирования заболевания). Всего к настоящему времени, по данным портала «GWAS Catalog» (<https://www.ebi.ac.uk/>), проведено более 70 такого рода ассоциативных исследований, в результате которых обнаружена ассоциация заболевания с более чем 500 однонуклеотидными ДНК-маркерами с достоверностью более 10^{-6} (https://www.ebi.ac.uk/gwas/efotraits/MONDO_0005180). Однако только для нескольких генов выявлено по несколько ассоциированных с развитием заболевания ДНК-маркеров, и фактически с учетом числа ассоциированных с заболеванием маркеров и степени достоверности ассоциации можно говорить о шести основных белок-кодирующих генах, определяющих многофакторный риск развития БП и/или влияющих на клиническое течение заболевания (табл. 2).

Также два из этих генов, *SNCA* и *LRRK2*, определяют развитие моногенных форм БП, и они же оказываются наиболее сильно ассоциированными с идиопатической формой заболевания как по числу ассоциированных ДНК-маркеров, так и по связанному с ними относительному риску. С развитием моногенных нейродегенеративных заболеваний связаны также мутации в гене ассоциированного с микротрубочками тау-белка, но клинические проявления этих мутаций связаны в первую очередь с клинической картиной лобно-височного слабоумия и эссенциального тремора. Характерные для БП мышечные нарушения оказываются вторичными по отношению к симптоматике деменции/тремора, и выявляемые при полногеномном анализе ассоциации отражают генетическую близость широкого спектра нейродегенеративных заболеваний [52–54].

Роль трех остальных ассоциированных с развитием заболевания генов изучена в настоящее время недостаточно, но имеющиеся данные об их функциональной активности позволяют связать их с современной картиной этиопатогенеза БП.

Ген *TMEM175* кодирует трансмембранный лизосомальный белок — ионный канал для ионов калия и протонов. Моделирование недостаточности этого белка в культуре нейрональных клеток *in vitro* показало, что снижение активности *TMEM175* приводит к нарушению контроля за рН лизосом. Это, в свою

очередь, снижает активность лизосомальных ферментов (в том числе GBA). В присутствии фибриллярного альфа-синуклеина наблюдается усиление его фосфорилирования с образованием нерастворимых включений, в состав которых входит альфа-синуклеин. *In vivo* у мышей с недостаточностью *TMEM175* наблюдалась гибель дофаминергических нейронов с развитием моторных нарушений [55–58]. Также с лизосомальной дисфункцией может быть связан ассоциированный с развитием БП ген *LAMP3*, кодирующий лизосомальный мембранно-ассоциированный белок и влияющий на процессы лизосомальной аутофагии и апоптоза, но его роль в функционировании нейрональных клеток практически не изучалась [59–61]. Крайне мало изучена роль в патогенезе БП белка *BST1/CD157* — гликопротеина из суперсемейства ADP-рибозил циклаз, связываемого в первую очередь с аутоиммунными, гематологическими и опухолевыми заболеваниями. Однако полученные в последнее время данные говорят о важной роли этого белка в регуляции обмена окситоцина и развитии нарушений поведения [62–64].

Подавляющая часть ассоциированных с развитием БП ДНК-маркеров оказывает незначительное влияние на риск развития заболевания — для подавляющего большинства маркеров относительный риск (OR) повышен или понижен не более чем в 1,5 раза. Проведенный в 2019 г. [65] метаанализ всех опубликованных к этому времени GWAS-исследований (7,8 млн (с учетом импьютинга) полиморфных ДНК-маркеров, 1,4 млн контрольных образцов ДНК, 37 700 пациентов с болезнью Паркинсона, 18 600 родственников первой степени пациентов с болезнью Паркинсона) позволил выявить всего 90 независимых и принадлежащих к 78 геномным областям ассоциированных с развитием заболевания ДНК-маркеров. 38 из этих маркеров ранее описаны не были, что связано в первую очередь с увеличением размера выборок, позволяющим добиться уровня полногеномной значимости для слабо ассоциированных маркеров (с достоверностью около 10^{-8}). Для этих новых ДНК-маркеров была проведена оценка кумулятивного генетического риска (PRS) развития БП, связанного с полиморфизмом генома, и было показано, что она не превышает 36% (если оценка частоты заболевания в популяции у лиц в возрасте 80 лет и старше составляет 2%). При этом необходимо учитывать, что в настоящее время не предложено общепринятой методологии оценки полилокусных рисков и, возможно, эта оценка может

Таблица 2. Белок кодирующие гены и ДНК-маркеры, наиболее высоко достоверно ассоциированные с риском развития идиопатической БП по данным полногеномных ассоциативных исследований

ГЕН	ДНК-маркер	P	OR	CI	Ссылка
<i>BST1/CD157</i>	rs11724635	1×10^{-19}	1,11	[1,09–1,14]	[112]
	rs11724635	9×10^{-18}	1,13	[1,1–1,15]	[113]
	rs11724635	1×10^{-16}	1,15	[1,11–1,19]	[114]
	rs4266290	8×10^{-11}	1,13	[1,08–1,17]	[115]
<i>TMEM175</i>	rs34311866	6×10^{-50}	1,23	[1,20–1,27]	[112]
	rs34311866	1×10^{-43}	1,27	[1,24–1,30]	[113]
	rs34311866	6×10^{-11}	1,25	[1,17–1,34]	[116]
	rs6599388	4×10^{-12}	1,16	[1,12–1,20]	[114]
<i>SNCA</i>	rs356182	5×10^{-123}	1,33	[1,30–1,36]	[112]
	rs356182	4×10^{-73}	1,32	[1,29–1,35]	[113]
	rs356182	1×10^{-56}	1,318	[1,27–1,36]	[115]
	rs356219	6×10^{-65}	1,29	[1,25–1,33]	[117]
<i>MCCC1/LAMP3</i>	rs12637471	2×10^{-30}	1,17	[1,15–1,22]	[112]
	rs12637471	2×10^{-21}	1,18	[1,15–1,22]	[113]
	rs11711441	8×10^{-12}	1,19	[1,13–1,25]	[114]
	rs10513789	3×10^{-10}	1,25	[1,16–1,33]	[118]
<i>MAPT</i>	rs17649553	1×10^{-68}	1,28	[1,25–1,32]	[112]
	rs17649553	2×10^{-48}	1,3	[1,27–1,34]	[113]
	rs8070723	7×10^{-12}	1,3	[1,19–1,43]	[119]
<i>LRRK2</i>	rs28903073	1×10^{-39}	3,12	[2,68–3,62]	[115]
	rs34637584	2×10^{-28}	9,62	[6,43–14,37]	[118]
	rs34778348	3×10^{-21}	2,23	[1,89–2,63]	[117]
	rs76904798	1×10^{-19}	1,15	[1,12–1,19]	[112]

Примечание. Приведены гены, для которых в независимых исследованиях выявлено не менее трех ДНК-маркеров с p ниже 10^{-10} .

существенно измениться при внедрении в практику стандартов для расчета PRS [66].

Таким образом, в настоящее время кумулятивная оценка риска развития БП оказывается не очень высокой как для моногенных форм, так и для многофакторных вариантов заболевания. Один из возможных вариантов связан с недооценкой роли в развитии заболевания редких мутаций или полиморфиз-

мов. Дальнейшее продолжение исследований в области широкомасштабного секвенирования геномов и экзоменов у пациентов позволит выявить новые локусы и гены, ассоциированные с развитием заболевания. При этом ключевую роль в такого рода исследованиях будет играть интеграция получаемых первичных данных в большие международные базы данных, объединенных с программами

функциональной аннотации таких редких вариантов. Первый пример такой базы данных — база Gene4PD [47], которая интегрирует результаты всех опубликованных работ по поиску патогенетически значимых генетических вариантов БП и позволяет на одной платформе провести аннотацию выявляемых вариантов с использованием данных по природе и частоте встречаемости генетического варианта, функциональной аннотации связанных с ним белков, транскриптомных и метиломных исследований. В итоге все гены на основании анализа выявленных в них ассоциированных с развитием БП вариантов могут быть отнесены к кандидатным генам заболевания высокой, средней и низкой достоверности.

Как говорилось выше, в ряде случаев (мутации в генах паркина, *PINK1*, альфа-синуклеина), кроме точечных мутаций, причиной заболевания могут быть мутации или полиморфизмы типа разных вариантов числа копий ДНК (copy number variation, CNV), при которых наблюдается делеция или дупликация фрагментов генома размером более 50 п.н. Мутации такого типа могут вносить важный вклад в общую вариабельность генома [67], и включение их в анализ генетического риска многофакторных заболеваний может существенно изменить наши оценки кумулятивного генетического риска. Один из примеров CNV-маркера, влияющего на риск развития БП, связан с синдромом X-сцепленной дистонии/паркинсонизма. Это заболевание вызывается инсерцией сложного ретротранспозона типа SINE-VNTR-Alu (SVA) в интрон 32 гена *TAF1*, кодирующего ассоциированный с ТАТА-связывающимся белком фактор 1. Эта инсерция приводит к нарушению экспрессии гена *TAF1*, причем особенно сильно изменяется экспрессия нейронального варианта мРНК. На фенотип заболевания и уровень мРНК оказывает влияние число мономеров (CCCTCT)_n в VNTR-повторе. Это число варьирует от 34 до 52 и влияет как на сравнительную выраженность дистонии/паркинсонизма, так и на возраст клинического дебюта заболевания [68–70].

Необходимо подчеркнуть, что в этом случае мутация не захватывает белок; кодирующую область гена и ее выявление и подтверждение патогенетической роли потребовало сложного комплекса исследований генома и транскриптома с привлечением методов геномного редактирования. Это, с одной стороны, подчеркивает сложность поиска патогенетически значимых мутаций такого типа и по крайней мере частично объясняет полученную в настоящее время относительно низкую оценку

генетического риска, основанную на анализе только однонуклеотидных ДНК-маркеров. С другой стороны, это указывает на важность поиска эпигенетических факторов, связанных с развитием заболевания — выявление тех или иных изменений эпигенома позволит лучше понять вызывающие их генетические причины.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В РАЗВИТИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

В последние годы интерес к роли эпигенетических механизмов и факторов в патогенезе нейродегенеративных заболеваний значительно возрос [71, 72]. При этом активно анализируются метилирование ДНК, модификация гистонов, экспрессия различных не кодирующих белок РНК (микроРНК, малые интерферирующие РНК, длинные некодирующие РНК). Эпигеном при этом рассматривается не только как причина заболевания, но и как возможная терапевтическая мишень.

Однако при рассмотрении вопросов, связанных с эпигенетическими механизмами БП, необходимо учитывать влияние на результаты проведенных исследований лимитирующих факторов.

Первый фактор связан с тем, что подавляющая часть эпигенетических работ не связана (по понятным причинам) с изучением эпигенома черной субстанции и стриатума и направлена на анализ периферических тканей, в первую очередь, крови. В некоторых исследованиях был проведен анализ аутопсийного материала, но в этих случаях изучались небольшие выборки пациентов, находившихся на поздних стадиях развития заболевания (четвертая-пятая стадии по Хен-Яру) и при наличии различных сопутствующих заболеваний, по сути, ставших причиной смерти [73, 74]. Также ведется активный анализ эпигенома у модельных объектов (клеточные линии, в том числе индуцированные плюрипотентные клетки и их производные, модельные животные с генетическими и токсическими моделями заболевания), но перенос полученных при этом данных на ситуацию у человека требует осторожности и аккуратности.

Второй фактор связан с длительным бессимптомным течением заболевания, и, по сути, все эпигенетические исследования проводятся на пациентах с выраженными моторными нарушениями. В лучшем случае выборки формируются из пациентов на первой или ранней второй стадии по Хен-Яру с включением в выборку только пациентов с первично постав-

ленным диагнозом «болезнь Паркинсона» до начала лечения. Это может быть важно, так как эпигенетические маркеры (например, уровень экспрессии микроРНК) могут реагировать на терапевтические воздействия [75]. В случае выявления эпигенетических изменений возникает вопрос об их причинной связи с развитием заболевания — изменения эпигенома могут быть также следствием поражения дофаминергических нейронов. Но и такие изменения крайне важны, так как они могут рассматриваться как маркеры течения патологического процесса. Анализ причинно-следственных связей в этом случае также потребует анализа различных моделей заболевания, хотя следует еще раз заметить, что перенос данных с модельного объекта на человека требует осторожности.

Первый активно изучаемый при БП эпигенетический фактор — метилирование ДНК. Было показано, что при этом заболевании наблюдается глобальное снижение уровня метилирования ДНК как в мозге (в том числе в стриатуме и черной субстанции), так и в периферических тканях [76]. Это снижение уровня метилирования обусловлено в нервной ткани взаимодействием между ДНК-метилтрансферазой 1 (DNMT1) и альфа-синуклеином, в результате которого DNMT1 накапливается в цитоплазме [77]. Показано также, что DNMT1 может связываться с геном альфа-синуклеина. В интроне 1 этого гена выявлены сайты связывания, обуславливающие дифференциальное метилирование ген *SNCA*. При этом не выявлено какой-либо ассоциации между полиморфными вариантами гена *DNMT1* и риском развития заболевания [78]. Выявлен ряд генов, уровень метилирования которых меняется при БП. Например, снижено метилирование генов транспортера дофамина (*DAT*), катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*), белка приона (*PRNP*), митохондриальных белков (*LARS2*, *MIR1977* и *DDAH2*) [79]. Но получаемые при анализе метилирования результаты плохо воспроизводимы. Проведенные за последние 10 лет полногеномные исследования глобального метилирования в тканях мозга пациентов с БП и здоровых лиц выявили только один ген, уровень метилирования которого менялся в нескольких работах — ген цитохрома P450 (*CYP2E1*) [80]. Низкая воспроизводимость может быть, в частности, связана с необходимостью учета при проведении анализа метилирования роли факторов внешней среды, влияющих как на риск развития БП, так и на дифференциальное метилирование. К числу таких факторов относятся курение,

употребление кофе, работа с пестицидами и тяжелыми металлами [80]. Важно также проводить комплексные исследования с включением в анализ не только профилей метилирования, но также поиска и аннотации дифференциально экспрессированных генов. Например, в работе Henderson et al. [81] в лимфоцитах периферической крови был выявлен ряд дифференциально метилированных при БП областей генома, и были обнаружены связанные с этими областями генома дифференциально экспрессирующиеся гены, хотя в большинстве случаев дифференциальное метилирование и дифференциальная экспрессия плохо коррелировали между собой.

Таким образом, в настоящее время трудно сделать окончательный вывод о вкладе метилирования ДНК в риск развития БП. Требуется проведение дополнительных широкомасштабных пролонгированных исследований на больших выборках пациентов, детально охарактеризованных как с клинической точки зрения, так и с точки зрения стиля жизни, причем основное внимание должно быть уделено больным на ранних стадиях заболевания. Аналогичный вывод можно сделать и в отношении другого активно анализируемого эпигенетического маркера — уровня экспрессии микроРНК.

Первые работы по анализу изменения экспрессии микроРНК в нервной ткани при БП были проведены в 2015–2016 гг. и дали весьма противоречивые результаты. Спектры дифференциально экспрессирующихся микроРНК практически не перекрывались. Это может быть связано как с использованием разных отделов мозга (черная субстанция и префронтальная кора) и применением разных методов анализа микроРНК (секвенирование, ПЦР в реальном времени, технология Nanostring), так и с разными клинико-морфологическими характеристиками пациентов. При этом необходимо отметить, что характеристика изучаемых лиц во всех публикациях крайне недостаточна — например, ни в одной из статей не приведено информации о стадии заболевания и клинической форме БП [73, 82, 83]. Всего к настоящему времени было выявлено 99 дифференциально экспрессирующихся в области черной субстанции микроРНК при БП, причем для 60 микроРНК уровень экспрессии был повышен, а для 39 — понижен [84]. Данные работы показали, что спектры микроРНК в мозге при БП существенно изменяются и такие изменения могут вызывать определенные нарушения в экспрессии генов ряда метаболических путей, связанных с патогенезом заболевания.

Особый интерес при этом представляют микроРНК, мишенями которых являются гены моногенных форм заболевания — такие микроРНК могут рассматриваться как связующее звено между идиопатическими и семейными формами. Например, у микроРНК miR-7 был выявлен сайт связывания в 3'-нетранслируемой области гена альфа-синуклеина, и было показано, что как *in vitro*, так и *in vivo* эта микроРНК блокирует трансляцию мРНК альфа-синуклеина и снижает уровень этого белка. При блокировании активности микроРНК miR-7 *in vivo* у мышей наблюдается гибель дофаминергических нейронов черной субстанции, снижение уровня дофамина и накопление в нервной ткани альфа-синуклеина [74]. Однако, в целом, ситуация оказывается более сложной, и экспрессия альфа-синуклеина оказывается под контролем сразу нескольких микроРНК, таких как miR-153, miR-203a-3p, miR-203a-3p, miR-30b, miR-34b/c, miR-214 и miR-433. Аналогичная ситуация наблюдается в случае других генов семейных форм БП. Так, экспрессия гена паркина регулируется как минимум четырьмя микроРНК (miR-103a-3p, miR-146a, miR-181a, miR-218), гена дардарина — двумя (miR-205, miR-599), гена белка DJ-1 — двумя (miR-494, miR-4639). В итоге микроРНК могут быть вовлечены в регуляцию (как позитивную, так и негативную) большого количества метаболических процессов, так или иначе связанных с развитием БП, таких как митохондриальная дисфункция и оксидантный стресс, аутофагия, апоптоз, процессы воспаления, экспрессия нейротрофинов [84, 85].

МикроРНК могут оказаться еще и связующим звеном между моногенными формами заболеваниями, идиопатическими случаями БП и воздействием факторов внешней среды — в первую очередь таких известных факторов риска развития болезни Паркинсона, как пестициды [86]. Было показано, что пестициды вызывают изменение профиля микроРНК в различных тканях организма, причем спектр таких изменений во многом перекрывается для разных пестицидов. Например, ротенон, паракват, органофосфаты и атразин вызывают изменение экспрессии микроРНК miR-34 [87], а как было сказано выше, эта микроРНК принимает участие в регуляции экспрессии альфа-синуклеина. Другая связь между генетическими факторами и микроРНК может быть обусловлена регуляцией экспрессии генов микроРНК на уровне транскрипции или стабильности транскрипта. Об этом известно крайне мало, но показано, что отдельные полиморфные сайты в геноме

человека могут влиять на связывание с ними микроРНК и тем самым модулировать экспрессию гена-мишени. В частности, это было продемонстрировано на примере однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) rs10024743 в 3'-нетранслируемой области гена альфа-синуклеина в сайте связывания микроРНК miR-34 (редкий аллель по данному ОНП) в системе *in vitro* снижал экспрессию альфа-синуклеина более чем в 2 раза [88]. В 3'-нетранслируемой области гена дардарина (*LRRK2*) был также выявлен rs66737902, который ассоциирован с риском развития БП и расположен в сайте связывания микроРНК miR-138-2-3p. Авторы считают, что именно нарушения связывания этой микроРНК с мРНК дардарина приводит к изменению уровня мРНК *LRRK2* и развитию патологического процесса [89].

Очень большую роль в формировании регуляторных сетей микроРНК, возможно, играют длинные некодирующие РНК (lncRNA) — РНК размером более 200 нуклеотидов, не содержащие открытых рамок считывания и не транслирующиеся в белки. Эти РНК могут считываться со смысловой и антисмысловой цепей ДНК и располагаться как в интронах генов, так и в межгенных областях. Точное число таких РНК-транскриптов и кодирующих их генов не известно — оно сопоставимо и, возможно, превышает число белок-кодирующих генов [90].

Описан ряд lncRNA, так или иначе связанных с биологическими процессами, ведущими к БП. Так, у мышей с токсическим (6-гидроксидофамин) поражением черной субстанции lncRNA H19 через связывание микроРНК miR-301b-3p активирует экспрессию гена тирозингидроксилазы и сигнальный путь Wnt/бета-катенин и тем самым способствует выживанию дофаминергических нейронов области черной субстанции. Снижение уровня РНК H19 вызывает, напротив, усиление процессов нейродегенерации [91]. Ряд lncRNA (такие как MALAT1, UCA1, SNGH14) регулируют процессы обмена альфа-синуклеина и формирование его агрегированных форм [92, 93]. Важно отметить, что многие из lncRNA могут оказывать влияние на разные процессы, связанные с развитием нейродегенерации. Так, MALAT1, кроме регуляции обмена альфа-синуклеина, принимает участие в модуляции процессов нейровоспаления и активирует экспрессию дардарина (*LRRK2*), тем самым усиливая процессы апоптоза и аутофагии в дофаминергических нейронах. Показано, что блокирование экспрессии этой lncRNA может повышать выживаемость дофаминергических

нейронов [92]. Активность дардарина также может контролировать и другая lncRNA — NEAT1. Она формирует внутриядерные включения (параспеклы), в состав которых входит ряд клеточных белков, включая дардарин. Это снижает уровень активного дардарина в клетке и тем самым повышает ее устойчивость к оксидантному стрессу [94].

Эпигенетические регуляторные взаимодействия не ограничены тремя выше описанными механизмами, но остальные варианты изучены намного хуже. Хотя показана возможная роль в патогенезе БП модификации гистонов [95], циклических РНК (circRNA) и конкурентных РНК (ceRNA) [96]. Работы по анализу эпигенетического профиля при БП должны быть расширены с включением новых моделей заболевания — как клеточных, так и организменных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 25 лет удалось выявить ряд генетических и эпигенетических факторов, связанных с патогенезом БП, и на этой основе, по сути, начато строительство своего рода Кельнского собора или *Саграда Фамилия*. Особенно близок второй вариант — все-таки как в случае *Саграда Фамилия*, так и в случае БП здание еще не построено, но основные контуры уже видны.

Для БП — это в первую очередь фундамент, гены основных моногенных форм БП, такие как *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*. Это, по сути, закладные камни, на основании которых были предложены первые механизмы этиопатогенеза заболевания с опорой на формирование агрегатов альфа-синуклеина, митохондриальную дисфункцию и нарушение процессов протеасомной деградации белков. Дальнейшее строительство с выявлением новых генов моногенных форм заболевания включило в число основных патологических механизмов БП лизосомальную дисфункцию и нарушение процессов везикулярного транспорта. Было сформулировано представление о едином

континууме взаимодействующих между собой клеточных процессов, приводящих к избирательной гибели дофаминергических нейронов при нарушении функционирования любого из его звеньев. Эта модель сохраняет свою актуальность и для идиопатической формы заболевания — полногеномный ассоциативный анализ выявил в качестве основных ассоциированных с заболеванием локусов гены *SNCA* и *LRRK2*. При этом очевидно, что мы пока не достроили стены до конца и не выявили все возможные гены, связанные с семейной и спорадической формами заболевания, но основное уже сделано, и появление нового гена (генов) не разрушит уже выстроенное здание.

Но для здания важна взаимная увязанность его частей, которая в случае организма достигается через эпигенетические взаимодействия, позволяющие обеспечить функционирование всего ансамбля генов при осуществлении ими заданной биологической функции. Нами сделаны первые и успешные шаги в этом направлении, но как раз в эпигенетической «отделке» здания предстоит сделать еще очень и очень многое. И это потребует разработки принципиально новых подходов как с точки зрения анализа молекулярных событий, связанных с эпигеномом, так и с точки зрения анализа данных с использованием методов машинного обучения и искусственного интеллекта [97, 98].

Вклад авторов. М.И. Шадрина — написание и редактирование текста; П.А. Сломинский — концепция и написание текста.

Финансирование. Обзор написан при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00262, М.И. Шадрина) и Министерства высшего образования и науки РФ (соглашения № 075-15-2021-1357, П.А. Сломинский).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bandres-Ciga, S., Ahmed, S., Sabir, M. S., Blauwendraat, C., Adames-Gomez, A. D., Bernal-Bernal, I., Bonilla-Toribio, M., Buiza-Rueda, D., Carrillo, F., Carrion-Claro, M., Gomez-Garre, P., Jesus, S., Labrador-Espinosa, M. A., Macias, D., Mendez-Del-Barrio, C., Perinan-Tocino, T., Tejera-Parrado, C., Vargas-Gonzalez, L., Diez-Fairen, M., Alvarez, I., Tartari, J. P., Buongiorno, M., Aguilar, M., Gorostidi, A., Bergareche, J. A., Mondragon, E., Vinagre-Aragon, A., Croitoru, I., Ruiz-Martinez, J.,

- Dols-Icardo, O., Kulisevsky, J., Marin-Lahoz, J., Pagonabarraga, J., Pascual-Sedano, B., Ezquerro, M., Camara, A., Compta, Y., Fernandez, M., Fernandez-Santiago, R., Munoz, E., Tolosa, E., Valldeoriola, F., Gonzalez-Aramburu, I., Sanchez Rodriguez, A., Sierra, M., Menendez-Gonzalez, M., Blazquez, M., Garcia, C., Suarez-San Martin, E., Garcia-Ruiz, P., Martinez-Castrillo, J. C., Vela-Desojo, L., Ruz, C., Barrero, F. J., Escamilla-Sevilla, F., Minguez-Castellanos, A., Cerdan, D., Tabernero, C., Gomez Heredia, M. J., Perez Errazquin, F., Romero-Acebal, M., Feliz, C., Lopez-Sendon, J. L., Mata, M., Martinez Torres, I., Kim, J. J., Dalgard, C. L., The American Genome Center, Brooks, J., Saez-Atienzar, S., Gibbs, J. R., Jorda, R., Botia, J. A., Bonet-Ponce, L., Morrison, K. E., Clarke, C., Tan, M., Morris, H., Edsall, C., Hernandez, D., Simon-Sanchez, J., Nalls, M. A., Scholz, S. W., Jimenez-Escrig, A., Duarte, J., Vives, F., Duran, R., Hoenicka, J., Alvarez, V., Infante, J., Marti, M. J., Clarimon, J., Lopez de Munain, A., Pastor, P., Mir, P., Singleton, A., and International Parkinson Disease Genomics Consortium (2019) The genetic architecture of Parkinson's disease in Spain: characterizing population-specific risk, differential haplotype structures, and providing etiologic insight, *Mov. Disord. Offic. J. Mov. Disord. Soc.*, **34**, 1851-1863, doi: 10.1002/mds.27864.
- Savitt, J. M., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2006) Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine, *J. Clin. Invest.*, **116**, 1744-1754, doi: 10.1172/JCI29178.
- Vázquez-Vélez, G. E., and Zoghbi, H. Y. (2021) Parkinson's disease genetics and pathophysiology, *Annu. Rev. Neurosci.*, **44**, 87-108, doi: 10.1146/annurev-neuro-100720-034518.
- Del Tredici, K., and Braak, H. (2016) Review: sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α -synuclein pathology, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **42**, 33-50, doi: 10.1111/nan.12298.
- Connolly, B. S., and Lang, A. E. (2014) Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review, *JAMA*, **311**, 1670-1683, doi: 10.1001/jama.2014.3654.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., and Nussbaum, R. L. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science*, **276**, 2045-2047, doi: 10.1126/science.276.5321.2045.
- Lunati, A., Lesage, S., and Brice, A. (2018) The genetic landscape of Parkinson's disease, *Rev. Neurolog.*, **174**, 628-643, doi: 10.1016/j.neurol.2018.08.004.
- Lesage, S., and Brice, A. (2012) Role of mendelian genes in "sporadic" Parkinson's disease, *Parkinson. Rel. Disord.*, **18 Suppl 1**, S66-S70, doi: 10.1016/s1353-8020(11)70022-0.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D., and Polymeropoulos, M. H. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature*, **395**, 451-452, doi: 10.1038/26652.
- Lee, Y. C., and Hsu, S. D. (2017) Familial mutations and post-translational modifications of UCH-L1 in Parkinson's disease and neurodegenerative disorders, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **18**, 733-745, doi: 10.2174/1389203717666160217143721.
- Wintermeyer, P., Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Berg, D., Becker, G., Leroy, E., Polymeropoulos, M., Berger, K., Przuntek, H., Schols, L., Epplen, J. T., and Riess, O. (2000) Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients, *Neuroreport*, **11**, 2079-2082, doi: 10.1097/00001756-200007140-00004.
- Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., Casas, J. P., Ahmadi, K. R., Lynch, T., Gandhi, S., Muqit, M. M., Foltynie, T., Barker, R., Bhatia, K. P., Quinn, N. P., Lees, A. J., Gibson, J. M., Holton, J. L., Revesz, T., Goldstein, D. B., and Wood, N. W. (2006) UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene, *Ann. Neurol.*, **59**, 627-633, doi: 10.1002/ana.20757.
- Miyake, Y., Tanaka, K., Fukushima, W., Kiyohara, C., Sasaki, S., Tsuboi, Y., Yamada, T., Oeda, T., Shimada, H., Kawamura, N., Sakae, N., Fukuyama, H., Hirota, Y., and Nagai, M. (2012) UCHL1 S18Y variant is a risk factor for Parkinson's disease in Japan, *BMC Neurol.*, **12**, 62, doi: 10.1186/1471-2377-12-62.
- Sun, S., Zhao, Y., Jin, G., and Kang, H. (2014) Lack of association between UCHL1 S18Y gene polymorphism and Parkinson's disease in the Asian population: a meta-analysis, *Neurol. Sci.*, **35**, 1867-1876, doi: 10.1007/s10072-014-1973-4.
- Saigoh, K., Wang, Y. L., Suh, J. G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., and Wada, K. (1999) Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice, *Nat. Genet.*, **23**, 47-51, doi: 10.1038/12647.
- Setsuie, R., Wang, Y. L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y. J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., and Wada, K. (2007) Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant, *Neurochem. Int.*, **50**, 119-129, doi: 10.1016/j.neuint.2006.07.015.
- Yasuda, T., Nihira, T., Ren, Y. R., Cao, X. Q., Wada, K., Setsuie, R., Kabuta, T., Wada, K., Hattori, N., Mizuno, Y., and Mochizuki, H. (2009) Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse

- model of Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **108**, 932-944, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05827.x.
18. Kyratzi, E., Pavlaki, M., and Stefanis, L. (2008) The S18Y polymorphic variant of UCH-L1 confers an antioxidant function to neuronal cells, *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 2160-2171, doi: 10.1093/hmg/ddn115.
 19. Xilouri, M., Kyratzi, E., Pitychoutis, P. M., Papadopoulou-Daifoti, Z., Perier, C., Vila, M., Maniati, M., Ulusoy, A., Kirik, D., Park, D. S., Wada, K., and Stefanis, L. (2012) Selective neuroprotective effects of the S18Y polymorphic variant of UCH-L1 in the dopaminergic system, *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 874-889, doi: 10.1093/hmg/ddr521.
 20. Riboldi, G. M., and Di Fonzo, A. B. (2019) GBA, Gaucher disease, and Parkinson's disease: from genetic to clinic to new therapeutic approaches, *Cells*, **8**, 364, doi: 10.3390/cells8040364.
 21. Thaler, A., Bregman, N., Gurevich, T., Shiner, T., Dror, Y., Zmira, O., Gan-Or, Z., Bar-Shira, A., Gana-Weisz, M., Orr-Urtreger, A., Giladi, N., and Mirelman, A. (2018) Parkinson's disease phenotype is influenced by the severity of the mutations in the GBA gene, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **55**, 45-49, doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.05.009.
 22. Thaler, A., Gurevich, T., Bar Shira, A., Gana Weisz, M., Ash, E., Shiner, T., Orr-Urtreger, A., Giladi, N., and Mirelman, A. (2017) A "dose" effect of mutations in the GBA gene on Parkinson's disease phenotype, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **36**, 47-51, doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.12.014.
 23. Gan-Or, Z., Liong, C., and Alcalay, R. N. (2018) GBA-associated Parkinson's disease and other synucleinopathies, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **18**, 44, doi: 10.1007/s11910-018-0860-4.
 24. Vieira, S. R. L., and Schapira, A. H. V. (2022) Glucocerebrosidase mutations and Parkinson's disease, *J. Neural Transmiss.*, **129**, 1105-1117, doi: 10.1007/s00702-022-02531-3.
 25. Kluss, J. H., Mamais, A., and Cookson, M. R. (2019) LRRK2 links genetic and sporadic Parkinson's disease, *Biochem. Soc. Transact.*, **47**, 651-661, doi: 10.1042/bst20180462.
 26. Lee, A. J., Wang, Y., Alcalay, R. N., Mejia-Santana, H., Saunders-Pullman, R., Bressman, S., Corvol, J. C., Brice, A., Lesage, S., Mangone, G., Tolosa, E., Pont-Sunyer, C., Vilas, D., Schüle, B., Kausar, F., Foroud, T., Berg, D., Brockmann, K., Goldwurm, S., Siri, C., Asselta, R., Ruiz-Martinez, J., Mondragón, E., Marras, C., Gbate, T., Giladi, N., Mirelman, A., and Marder, K. (2017) Penetrance estimate of LRRK2 p.G2019S mutation in individuals of non-Ashkenazi Jewish ancestry, *Mov. Disord.*, **32**, 1432-1438, doi: 10.1002/mds.27059.
 27. Trinh, J., Guella, I., and Farrer, M. J. (2014) Disease penetrance of late-onset parkinsonism: a meta-analysis, *JAMA Neurol.*, **71**, 1535-1539, doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1909.
 28. Kestenbaum, M., and Alcalay, R. N. (2017) Clinical features of LRRK2 carriers with Parkinson's disease, *Adv. Neurobiol.*, **14**, 31-48, doi: 10.1007/978-3-319-49969-7_2.
 29. Guadagnolo, D., Piane, M., Torrisi, M. R., Pizzuti, A., and Petrucci, S. (2021) Genotype-phenotype correlations in monogenic Parkinson's disease: a review on clinical and molecular findings, *Front. Neurol.*, **12**, 648588, doi: 10.3389/fneur.2021.648588.
 30. Milanowski, Ł., M., Lindemann, J. A., Hoffman-Zacharska, D., Soto-Beasley, A. I., Barcikowska, M., Boczarska-Jedynak, M., Deutschland, A., Kłodowska, G., Dulski, J., Fedoryshyn, L., Friedman, A., Jamrozik, Z., Janik, P., Karpinsky, K., Kozirowski, D., Krygowska-Wajs, A., Jasińska-Myga, B., Opala, G., Potulska-Chromik, A., Pulyk, A., Rektorova, I., Sanotsky, Y., Siuda, J., Sławek, J., Śmiłowska, K., Szczechowski, L., Rudzińska-Bar, M., Walton, R. L., Ross, O. A., and Wszolek, Z. K. (2021) Frequency of mutations in PRKN, PINK1, and DJ1 in patients with early-onset Parkinson's disease from neighboring countries in Central Europe, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **86**, 48-51, doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.03.026.
 31. Olszewska, D. A., McCarthy, A., Soto-Beasley, A. I., Walton, R. L., Ross, O. A., and Lynch, T. (2022) PARKIN, PINK1, and DJ1 analysis in early-onset Parkinson's disease in Ireland, *Irish J. Med. Sci.*, **191**, 901-907, doi: 10.1007/s11845-021-02563-w.
 32. Erer, S., Egeli, U., Zarifoglu, M., Tezcan, G., Cecener, G., Tunca, B., Ak, S., Demirdogen, E., Kenangil, G., Kalegasi, H., Dogu, O., Saka, E., and Elibil, B. (2016) Mutation analysis of the PARKIN, PINK1, DJ1, and SNCA genes in Turkish early-onset Parkinson's patients and genotype-phenotype correlations, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **148**, 147-153, doi: 10.1016/j.clineuro.2016.07.005.
 33. Shulska, M. V., Shadrina, M. I., Fedotova, E. Y., Abramycheva, N. Y., Limborska, S. A., Illarioshkin, S. N., and Slominsky, P. A. (2017) Second mutation in PARK2 is absent in patients with sporadic Parkinson's disease and heterozygous exonic deletions/duplications in parkin gene, *Int. J. Neurosci.*, **127**, 781-784, doi: 10.1080/00207454.2016.1255612.
 34. Semenova, E. V., Shadrina, M. I., Slominsky, P. A., Ivanova-Smolenskaya, I. A., Bagyeva, G., Illarioshkin, S. N., and Limborska, S. A. (2012) Analysis of PARK2 gene exon rearrangements in Russian patients with sporadic Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **27**, 139-142, doi: 10.1002/mds.23901.
 35. Valente, E. M., and Ferraris, A. (2007) Heterozygous mutations in genes causing parkinsonism: monogenic disorders go complex, *Lancet Neurol.*, **6**, 576-578, doi: 10.1016/s1474-4422(07)70158-8.
 36. Brüggemann, N., Mitterer, M., Lanthaler, A. J., Djarmati, A., Hagenah, J., Wiegers, K., Winkler, S., Pawlack, H., Lohnau, T., Pramstaller, P. P., Klein, C., and Lohmann, K. (2009) Frequency of heterozygous

- Parkin mutations in healthy subjects: need for careful prospective follow-up examination of mutation carriers, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **15**, 425-429, doi: 10.1016/j.parkreldis.2008.11.014.
37. Pavese, N., Khan, N. L., Scherfler, C., Cohen, L., Brooks, D. J., Wood, N. W., Bhatia, K. P., Quinn, N. P., Lees, A. J., and Piccini, P. (2009) Nigrostriatal dysfunction in homozygous and heterozygous parkin gene carriers: an 18F-dopa PET progression study, *Mov. Disord.*, **24**, 2260-2266, doi: 10.1002/mds.22817.
 38. Van Nuenen, B. F., van Eimeren, T., van der Vegt, J. P., Buhmann, C., Klein, C., Bloem, B. R., and Siebner, H. R. (2009) Mapping preclinical compensation in Parkinson's disease: an imaging genomics approach, *Mov. Disord.*, **24 Suppl 2**, S703-S710, doi: 10.1002/mds.22635.
 39. Marongiu, R., Ferraris, A., Ialongo, T., Michiorri, S., Soleti, F., Ferrari, F., Elia, A. E., Ghezzi, D., Albanese, A., Altavista, M. C., Antonini, A., Barone, P., Brusa, L., Cortelli, P., Martinelli, P., Pellicchia, M. T., Pezzoli, G., Scaglione, C., Stanzione, P., Tinazzi, M., Zecchinelli, A., Zeviani, M., Cassetta, E., Garavaglia, B., Dallapiccola, B., Bentivoglio, A. R., and Valente, E. M. (2008) PINK1 heterozygous rare variants: prevalence, significance and phenotypic spectrum, *Hum. Mutat.*, **29**, 565, doi: 10.1002/humu.20719.
 40. Yu, E., Rudakou, U., Krohn, L., Mufti, K., Ruskey, J. A., Asayesh, F., Estiar, M. A., Spiegelman, D., Surface, M., Fahn, S., Waters, C. H., Greenbaum, L., Espay, A. J., Dauvilliers, Y., Dupré, N., Rouleau, G. A., Hassin-Baer, S., Fon, E. A., Alcalay, R. N., and Gan-Or, Z. (2021) Analysis of heterozygous PRKN variants and copy-number variations in Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **36**, 178-187, doi: 10.1002/mds.28299.
 41. Jia, F., Fellner, A., and Kumar, K. R. (2022) Monogenic Parkinson's disease: genotype, phenotype, pathophysiology, and genetic testing, *Genes*, **13**, 471, doi: 10.3390/genes13030471.
 42. Santos-Lobato, B. L., Schumacher-Schuh, A., Mata, I. F., Letro, G. H., Braga-Neto, P., Brandão, P. R. P., Godeiro-Junior, C. O., Coletta, M. V. D., Camargos, S. T., Borges, V., Rieder, C. R. M., and Tumas, V. (2021) Genetics of Parkinson's disease in Brazil: a systematic review of monogenic forms, *Arq. Neuropsiquiatr.*, **79**, 612-623, doi: 10.1590/0004-282X-anp-2020-0409.
 43. Correia Guedes, L., Ferreira, J. J., Rosa, M. M., Coelho, M., Bonifati, V., and Sampaio, C. (2010) Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: a systematic review, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **16**, 237-242, doi: 10.1016/j.parkreldis.2009.11.004.
 44. Gialluisi, A., Reccia, M. G., Modugno, N., Natile, T., Lombardi, A., Di Giovannantonio, L. G., Pietracupa, S., Ruggiero, D., Scala, S., Gambardella, S., Iacoviello, L., Gianfrancesco, F., Acampora, D., D'Esposito, M., Simeone, A., Ciullo, M., and Esposito, T. (2021) Identification of sixteen novel candidate genes for late onset Parkinson's disease, *Mol. Neurodegener.*, **16**, 35, doi: 10.1186/s13024-021-00455-2.
 45. Shulskaya, M. V., Alieva, A. K., Vlasov, I. N., Zyrin, V. V., Fedotova, E. Y., Abramychева, N. Y., Usenko, T. S., Yakimovsky, A. F., Emelyanov, A. K., Pchelina, S. N., Illarioshkin, S. N., Slominsky, P. A., and Shadrina, M. I. (2018) Whole-exome sequencing in searching for new variants associated with the development of Parkinson's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **10**, 136, doi: 10.3389/fnagi.2018.00136.
 46. Cook, L., Schulze, J., Verbrugge, J., Beck, J. C., Marder, K. S., Saunders-Pullman, R., Klein, C., Naito, A., and Alcalay, R. N. (2021) The commercial genetic testing landscape for Parkinson's disease, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **92**, 107-111, doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.10.001.
 47. Li, B., Zhao, G., Zhou, Q., Xie, Y., Wang, Z., Fang, Z., Lu, B., Qin, L., Zhao, Y., Zhang, R., Jiang, L., Pan, H., He, Y., Wang, X., Luo, T., Zhang, Y., Wang, Y., Chen, Q., Liu, Z., Guo, J., Tang, B., and Li, J. (2021) Gene4PD: a comprehensive genetic database of Parkinson's disease, *Front. Neurosci.*, **15**, 679568, doi: 10.3389/fnins.2021.679568.
 48. Day, J. O., and Mullin, S. (2021) The genetics of Parkinson's disease and implications for clinical practice, *Genes*, **12**, 1006, doi: 10.3390/genes12071006.
 49. Fung, H. C., Scholz, S., Matarin, M., Simón-Sánchez, J., Hernandez, D., Britton, A., Gibbs, J. R., Langefeld, C., Stiebert, M. L., Schymick, J., Okun, M. S., Mandel, R. J., Fernandez, H. H., Foote, K. D., Rodríguez, R. L., Peckham, E., De Vrieze, F. W., Gwinn-Hardy, K., Hardy, J. A., and Singleton, A. (2006) Genome-wide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data, *Lancet Neurol.*, **5**, 911-916, doi: 10.1016/s1474-4422(06)70578-6.
 50. Maraganore, D. M., de Andrade, M., Lesnick, T. G., Strain, K. J., Farrer, M. J., Rocca, W. A., Pant, P. V., Frazer, K. A., Cox, D. R., and Ballinger, D. G. (2005) High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease, *Am. J. Hum. Genet.*, **77**, 685-693, doi: 10.1086/496902.
 51. Evangelou, E., Maraganore, D. M., and Ioannidis, J. P. (2007) Meta-analysis in genome-wide association datasets: strategies and application in Parkinson's disease, *PLoS One*, **2**, e196, doi: 10.1371/journal.pone.0000196.
 52. Leveille, E., Ross, O. A., and Gan-Or, Z. (2021) Tau and MAPT genetics in tauopathies and synucleinopathies, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **90**, 142-154, doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.09.008.
 53. Clark, L. N., Gao, Y., Wang, G. T., Hernandez, N., Ashley-Koch, A., Jankovic, J., Ottman, R., Leal, S. M., Rodriguez, S. M. B., and Louis, E. D. (2022)

- Whole genome sequencing identifies candidate genes for familial essential tremor and reveals biological pathways implicated in essential tremor aetiology, *EBioMedicine*, **85**, 104290, doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104290.
54. Drazich-Taylor, E. H. S., Todd, E., Convery, R., Bocchetta, M., Clarke, M., Warren, J. D., Fox, N. C., Revesz, T., and Rohrer, J. D. (2023) Q351R MAPT mutation is associated with a mixed 3R/4R tauopathy and a slowly progressive cognitive, behavioural and parkinsonian syndrome, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **94**, 169-171, doi: 10.1136/jnnp-2022-329330.
 55. Hu, M., Li, P., Wang, C., Feng, X., Geng, Q., Chen, W., Marthi, M., Zhang, W., Gao, C., Reid, W., Swanson, J., Du, W., Hume, R. I., and Xu, H. (2022) Parkinson's disease-risk protein TMEM175 is a proton-activated proton channel in lysosomes, *Cell*, **185**, 2292-2308.e2220, doi: 10.1016/j.cell.2022.05.021.
 56. Jinn, S., Drolet, R. E., Cramer, P. E., Wong, A. H., Toolan, D. M., Gretzula, C. A., Voleti, B., Vassileva, G., Disa, J., Tadin-Strapps, M., and Stone, D. J. (2017) TMEM175 deficiency impairs lysosomal and mitochondrial function and increases α -synuclein aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2389-2394, doi: 10.1073/pnas.1616332114.
 57. Krohn, L., Öztürk, T. N., Vanderperre, B., Ouled Amar Bencheikh, B., Ruskey, J. A., Laurent, S. B., Spiegelman, D., Postuma, R. B., Arnulf, I., Hu, M. T. M., Dauvilliers, Y., Högl, B., Stefani, A., Monaca, C. C., Plazzi, G., Antelmi, E., Ferini-Strambi, L., Heidebreder, A., Rudakou, U., Cochen De Cock, V., Young, P., Wolf, P., Oliva, P., Zhang, X. K., Greenbaum, L., Liong, C., Gagnon, J. F., Desautels, A., Hassin-Baer, S., Montplaisir, J. Y., Dupré, N., Rouleau, G. A., Fon, E. A., Trempe, J. F., Lamoureux, G., Alcalay, R. N., and Gan-Or, Z. (2020) Genetic, structural, and functional evidence Link TMEM175 to synucleinopathies, *Ann. Neurol.*, **87**, 139-153, doi: 10.1002/ana.25629.
 58. Wie, J., Liu, Z., Song, H., Tropea, T. F., Yang, L., Wang, H., Liang, Y., Cang, C., Aranda, K., Lohmann, J., Yang, J., Lu, B., Chen-Plotkin, A. S., Luk, K. C., and Ren, D. (2021) A growth-factor-activated lysosomal K^+ channel regulates Parkinson's pathology, *Nature*, **591**, 431-437, doi: 10.1038/s41586-021-03185-z.
 59. Lunding, L. P., Krause, D., Stichtenoth, G., Stamme, C., Lauterbach, N., Hegemann, J., Ochs, M., Schuster, B., Sedlacek, R., Saftig, P., Schwudke, D., Wegmann, M., and Damme, M. (2021) LAMP3 deficiency affects surfactant homeostasis in mice, *PLoS Genet.*, **17**, e1009619, doi: 10.1371/journal.pgen.1009619.
 60. Tanaka, T., Warner, B. M., Michael, D. G., Nakamura, H., Odani, T., Yin, H., Atsumi, T., Noguchi, M., and Chiorini, J. A. (2022) LAMP3 inhibits autophagy and contributes to cell death by lysosomal membrane permeabilization, *Autophagy*, **18**, 1629-1647, doi: 10.1080/15548627.2021.1995150.
 61. Tanaka, T., Warner, B. M., Odani, T., Ji, Y., Mo, Y. Q., Nakamura, H., Jang, S. I., Yin, H., Michael, D. G., Hirata, N., Suizu, F., Ishigaki, S., Oliveira, F. R., Motta, A. C. F., Ribeiro-Silva, A., Rocha, E. M., Atsumi, T., Noguchi, M., and Chiorini, J. A. (2020) LAMP3 induces apoptosis and autoantigen release in Sjögren's syndrome patients, *Sci. Rep.*, **10**, 15169, doi: 10.1038/s41598-020-71669-5.
 62. Chosa, N., and Ishisaki, A. (2018) Two novel mechanisms for maintenance of stemness in mesenchymal stem cells: SCRG1/BST1 axis and cell-cell adhesion through N-cadherin, *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, **54**, 37-44, doi: 10.1016/j.jdsr.2017.10.001.
 63. Higashida, H., Hashii, M., Tanaka, Y., Matsukawa, S., Higuchi, Y., Gabata, R., Tsubomoto, M., Seishima, N., Teramachi, M., Kamijima, T., Hattori, T., Hori, O., Tsuji, C., Cherepanov, S. M., Shabalova, A. A., Gerasimenko, M., Minami, K., Yokoyama, S., Munesue, S. I., Harashima, A., Yamamoto, Y., Salmina, A. B., and Lopatina, O. (2019) CD38, CD157, and RAGE as molecular determinants for social behavior, *Cells*, **9**, 62, doi: 10.3390/cells9010062.
 64. Ortolan, E., Augeri, S., Fissolo, G., Musso, I., and Funaro, A. (2019) CD157: From immunoregulatory protein to potential therapeutic target, *Immunol. Lett.*, **205**, 59-64, doi: 10.1016/j.imlet.2018.06.007.
 65. Blauwendraat, C., Nalls, M. A., and Singleton, A. B. (2020) The genetic architecture of Parkinson's disease, *Lancet Neurol.*, **19**, 170-178, doi: 10.1016/S1474-4422(19)30287-X.
 66. Wand, H., Lambert, S. A., Tamburro, C., Iacocca, M. A., O'Sullivan, J. W., Sillari, C., Kullo, I. J., Rowley, R., Dron, J. S., Brockman, D., Venner, E., McCarthy, M. I., Antoniou, A. C., Easton, D. F., Hegele, R. A., Khera, A. V., Chatterjee, N., Kooperberg, C., Edwards, K., Vlessis, K., Kinnear, K., Danesh, J. N., Parkinson, H., Ramos, E. M., Roberts, M. C., Ormond, K. E., Khoury, M. J., Janssens, A., Goddard, K. A. B., Kraft, P., MacArthur, J. A. L., Inouye, M., and Wojcik, G. L. (2021) Improving reporting standards for polygenic scores in risk prediction studies, *Nature*, **591**, 211-219, doi: 10.1038/s41586-021-03243-6.
 67. Pang, A. W., MacDonald, J. R., Pinto, D., Wei, J., Rafiq, M. A., Conrad, D. F., Park, H., Hurles, M. E., Lee, C., Venter, J. C., Kirkness, E. F., Levy, S., Feuk, L., and Scherer, S. W. (2010) Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome, *Genome Biol.*, **11**, R52, doi: 10.1186/gb-2010-11-5-r52.
 68. Ng, A. R., Jamora, R. D. G., and Rosales, R. L. (2021) X-linked dystonia Parkinsonism: crossing a new threshold, *J. Neural Transm.*, **128**, 567-573, doi: 10.1007/s00702-021-02324-0.
 69. Di Lazzaro, G., Magrinelli, F., Estevez-Fraga, C., Valente, E. M., Pisani, A., and Bhatia, K. P.

- (2021) X-linked Parkinsonism: phenotypic and genetic heterogeneity, *Mov. Disord.*, **36**, 1511-1525, doi: 10.1002/mds.28565.
70. Bragg, D. C., Sharma, N., and Ozelius, L. J. (2019) X-Linked Dystonia-Parkinsonism: recent advances, *Curr. Opin. Neurol.*, **32**, 604-609, doi: 10.1097/wco.0000000000000708.
71. Marques, S. C., Oliveira, C. R., Pereira, C. M., and Outeiro, T. F. (2011) Epigenetics in neurodegeneration: a new layer of complexity, *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **35**, 348-355, doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.08.008.
72. Mohd Murshid, N., Aminullah Lubis, F., and Makpol, S. (2022) Epigenetic changes and its intervention in age-related neurodegenerative diseases, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **42**, 577-595, doi: 10.1007/s10571-020-00979-z.
73. Briggs, C. E., Wang, Y., Kong, B., Woo, T. U., Iyer, L. K., and Sonntag, K. C. (2015) Midbrain dopamine neurons in Parkinson's disease exhibit a dysregulated miRNA and target-gene network, *Brain Res.*, **1618**, 111-121, doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.021.
74. McMillan, K. J., Murray, T. K., Bengoa-Vergniory, N., Cordero-Llana, O., Cooper, J., Buckley, A., Wade-Martins, R., Uney, J. B., O'Neill, M. J., Wong, L. F., and Caldwell, M. A. (2017) Loss of microRNA-7 regulation leads to alpha-synuclein accumulation and dopaminergic neuronal loss *in vivo*, *Mol. Ther.*, **25**, 2404-2414, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.017.
75. Alieva, A., Filatova, E. V., Karabanov, A. V., Illarioshkin, S. N., Limborska, S. A., Shadrina, M. I., and Slominsky, P. A. (2015) miRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **21**, 72-74, doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.10.018.
76. Wang, C., Chen, L., Zhang, M., Yang, Y., and Wong, G. (2020) PDmethDB: A curated Parkinson's disease associated methylation information database, *Computat. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 3745-3749, doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.015.
77. Desplats, P., Spencer, B., Coffee, E., Patel, P., Michael, S., Patrick, C., Adame, A., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2011) Alpha-synuclein sequesters Dnmt1 from the nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 9031-9037, doi: 10.1074/jbc.C110.212589.
78. Pezzi, J. C., de Bem, C. M., da Rocha, T. J., Schumacher-Schuh, A. F., Chaves, M. L., Rieder, C. R., Hutz, M. H., Fiegenbaum, M., and Camozzato, A. L. (2017) Association between DNA methyltransferase gene polymorphism and Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **639**, 146-150, doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.058.
79. Angelopoulou, E., Paudel, Y. N., Papageorgiou, S. G., and Piperi, C. (2022) Environmental impact on the epigenetic mechanisms underlying Parkinson's disease pathogenesis: a narrative review, *Brain Sci.*, **12**, 175, doi: 10.3390/brainsci12020175.
80. Schaffner, S. L., and Kobor, M. S. (2022) DNA methylation as a mediator of genetic and environmental influences on Parkinson's disease susceptibility: impacts of alpha-Synuclein, physical activity, and pesticide exposure on the epigenome, *Front. Genet.*, **13**, 971298, doi: 10.3389/fgene.2022.971298.
81. Henderson, A. R., Wang, Q., Meechoovet, B., Siniard, A. L., Naymik, M., De Both, M., Huentelman, M. J., Caselli, R. J., Driver-Dunkley, E., and Dunkley, T. (2021) DNA methylation and expression profiles of whole blood in Parkinson's disease, *Front. Genet.*, **12**, 640266, doi: 10.3389/fgene.2021.640266.
82. Hoss, A. G., Labadorf, A., Beach, T. G., Latourelle, J. C., and Myers, R. H. (2016) MicroRNA profiles in Parkinson's disease prefrontal cortex, *Front. Aging Neurosci.*, **8**, 36, doi: 10.3389/fnagi.2016.00036.
83. Nair, V. D., and Ge, Y. (2016) Alterations of miRNAs reveal a dysregulated molecular regulatory network in Parkinson's disease striatum, *Neurosci. Lett.*, **629**, 99-104, doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.061.
84. Santos-Lobato, B. L., Vidal, A. F., and Ribeiro-Dos-Santos, Â. (2021) Regulatory miRNA-mRNA networks in Parkinson's disease, *Cells*, **10**, 1410, doi: 10.3390/cells10061410.
85. Saghazadeh, A., and Rezaei, N. (2022) MicroRNA machinery in Parkinson's disease: a platform for neurodegenerative diseases, *Exp. Rev. Neurother.*, **22**, 427-453, doi: 10.1586/14737175.2015.1114886.
86. Ahmed, H., Abushouk, A. I., Gabr, M., Negida, A., and Abdel-Daim, M. M. (2017) Parkinson's disease and pesticides: a meta-analysis of disease connection and genetic alterations, *Biomed. Pharmacother.*, **90**, 638-649, doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.100.
87. Aloizou, A. M., Siokas, V., Sapouni, E. M., Sita, N., Liampas, I., Brotis, A. G., Rakitskii, V. N., Burykina, T. I., Aschner, M., Bogdanos, D. P., Tsatsakis, A., Hadjigeorgiou, G. M., and Dardiotis, E. (2020) Parkinson's disease and pesticides: are microRNAs the missing link? *Sci. Total Environ.*, **744**, 140591, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140591.
88. Kabaria, S., Choi, D. C., Chaudhuri, A. D., Mouradian, M. M., and Junn, E. (2015) Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances α -synuclein expression in Parkinson's disease, *FEBS Lett.*, **589**, 319-325, doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.014.
89. Cardo, L. F., Coto, E., Ribacoba, R., Mata, I. F., Moris, G., Menéndez, M., and Alvarez, V. (2014) The screening of the 3'-UTR sequence of LRRK2 identified an association between the rs66737902 polymorphism and Parkinson's disease, *J. Hum. Genet.*, **59**, 346-348, doi: 10.1038/jhg.2014.26.
90. Nadhan, R., Isidoro, C., Song, Y. S., and Dhanasekaran, D. N. (2022) Signaling by LncRNAs: structure, cellular homeostasis, and disease pathology, *Cells*, **11**, 2517, doi: 10.3390/cells11162517.
91. Jiang, J., Piao, X., Hu, S., Gao, J., and Bao, M. (2020) LncRNA H19 diminishes dopaminergic neuron loss by

- mediating microRNA-301b-3p in Parkinson's disease via the HPRT1-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Aging*, **12**, 8820-8836, doi: 10.18632/aging.102877.
92. Abrishamdar, M., Jalali, M. S., and Rashno, M. (2022) MALAT1 lncRNA and Parkinson's disease: the role in the pathophysiology and significance for diagnostic and therapeutic approaches, *Mol. Neurobiol.*, **59**, 5253-5262, doi: 10.1007/s12035-022-02899-z.
 93. Taghizadeh, E., Gheibihayat, S. M., Taheri, F., Afshani, S. M., Farahani, N., and Saberi, A. (2021) LncRNAs as putative biomarkers and therapeutic targets for Parkinson's disease, *Neurol. Sci.*, **42**, 4007-4015, doi: 10.1007/s10072-021-05408-7.
 94. Simchovitz, A., Hanan, M., Niederhoffer, N., Madrer, N., Yayon, N., Bennett, E. R., Greenberg, D. S., Kadener, S., and Soreq, H. (2019) NEAT1 is overexpressed in Parkinson's disease substantia nigra and confers drug-inducible neuroprotection from oxidative stress, *FASEB J.*, **33**, 11223-11234, doi: 10.1096/fj.201900830R.
 95. Li, Y., Gu, Z., Lin, S., Chen, L., Dzreyan, V., Eid, M., Demyanenko, S., and He, B. (2022) Histone deacetylases as epigenetic targets for treating Parkinson's disease, *Brain Sci.*, **12**, 672, doi: 10.3390/brainsci12050672.
 96. Zhang, H., Yao, L., Zheng, Z., Koc, S., and Lu, G. (2022) The role of non-coding RNAs in the pathogenesis of Parkinson's disease: recent advancement, *Pharmaceuticals*, **15**, 811, doi: 10.3390/ph15070811.
 97. Helmy, M., Eldaydamony, E., Mekky, N., Elmogy, M., and Soliman, H. (2022) Predicting Parkinson's disease related genes based on PyFeat and gradient boosted decision tree, *Sci. Rep.*, **12**, 10004, doi: 10.1038/s41598-022-14127-8.
 98. Farrow, S. L., Schierding, W., Gokuladhas, S., Golovina, E., Fadason, T., Cooper, A. A., and O'Sullivan, J. M. (2022) Establishing gene regulatory networks from Parkinson's disease risk loci, *Brain*, **145**, 2422-2435, doi: 10.1093/brain/awac022.
 99. Quinn, P. M. J., Moreira, P. I., Ambrósio, A. F., and Alves, C. H. (2020) PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation, *Acta Neuropathol. Commun.*, **8**, 189, doi: 10.1186/s40478-020-01062-w.
 100. Dolgacheva, L. P., Berezhnov, A. V., Fedotova, E. I., Zinchenko, V. P., and Abramov, A. Y. (2019) Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **51**, 175-188, doi: 10.1007/s10863-019-09798-4.
 101. Usmani, A., Shavarebi, F., and Hiniker, A. (2021) The cell biology of LRRK2 in Parkinson's disease, *Mol. Cell. Biol.*, **41**, 1-16, doi: 10.1128/mcb.00660-20.
 102. Tanaka, K. (2020) The PINK1-Parkin axis: an overview, *Neurosci. Res.*, **159**, 9-15, doi: 10.1016/j.neures.2020.01.006.
 103. Cohen, B. H., Chinnery, P. F., and Copeland, W. C. (1993) POLG-related disorders, in *GeneReviews* (Adam, M. P., Everman, D. B., Mirzaa, G. M., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J. H., Gripp, K. W., and Amemiya, A., eds) University of Washington, Seattle.
 104. Van Veen, S., Martin, S., Van den Haute, C., Benoy, V., Lyons, J., Vanhoutte, R., Kahler, J. P., Decuyper, J. P., Gelders, G., Lambie, E., Zielich, J., Swinnen, J. V., Annaert, W., Agostinis, P., Ghesquière, B., Verhelst, S., Baekelandt, V., Eggermont, J., and Vangheluwe, P. (2020) ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export, *Nature*, **578**, 419-424, doi: 10.1038/s41586-020-1968-7.
 105. Joseph, S., Schulz, J. B., and Stegmüller, J. (2018) Mechanistic contributions of FBXO7 to Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **144**, 118-127, doi: 10.1111/jnc.14253.
 106. Zhou, Z. D., Lee, J. C. T., and Tan, E. K. (2018) Pathophysiological mechanisms linking F-box only protein 7 (FBXO7) and Parkinson's disease (PD), *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **778**, 72-78, doi: 10.1016/j.mrrev.2018.10.001.
 107. Lin, G., Lee, P. T., Chen, K., Mao, D., Tan, K. L., Zuo, Z., Lin, W. W., Wang, L., and Bellen, H. J. (2018) Phospholipase PLA2G6, a Parkinsonism-associated gene, affects Vps26 and Vps35, retromer function, and ceramide levels, similar to α -synuclein gain, *Cell Metab.*, **28**, 605-618.e606, doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.019.
 108. Sassone, J., Reale, C., Dati, G., Regoni, M., Pellicchia, M. T., and Garavaglia, B. (2021) The role of VPS35 in the pathobiology of Parkinson's disease, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **41**, 199-227, doi: 10.1007/s10571-020-00849-8.
 109. Roosen, D. A., Blauwendraat, C., Cookson, M. R., and Lewis, P. A. (2019) DNAJC proteins and pathways to parkinsonism, *FEBS J.*, **286**, 3080-3094, doi: 10.1111/febs.14936.
 110. Choudhry, H., Aggarwal, M., and Pan, P. Y. (2021) Mini-review: synaptojanin 1 and its implications in membrane trafficking, *Neurosci. Lett.*, **765**, 136288, doi: 10.1016/j.neulet.2021.136288.
 111. Monfrini, E., Spagnolo, F., Canesi, M., Seresini, A., Rini, A., Passarella, B., Percetti, M., Seia, M., Goldwurm, S., Cereda, V., Comi, G. P., Pezzoli, G., and Di Fonzo, A. (2022) VPS13C-associated Parkinson's disease: two novel cases and review of the literature, *Parkinsonism Rel. Disord.*, **94**, 37-39, doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.11.031.
 112. Chang, D., Nalls, M. A., Hallgrímsdóttir, I. B., Hunkapiller, J., van der Brug, M., Cai, F., Kerchner, G. A., Ayalon, G., Bingol, B., Sheng, M., Hinds, D., Behrens, T. W., Singleton, A. B., Bhangale, T. R., and Graham, R. R. (2017) A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci, *Nat. Genet.*, **49**, 1511-1516, doi: 10.1038/ng.3955.

113. Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., DeStefano, A. L., Kara, E., Bras, J., Sharma, M., Schulte, C., Keller, M. F., Arepalli, S., Letson, C., Edsall, C., Stefansson, H., Liu, X., Pliner, H., Lee, J. H., Cheng, R., Ikram, M. A., Ioannidis, J. P., Hadjigeorgiou, G. M., Bis, J. C., Martinez, M., Perlmutter, J. S., Goate, A., Marder, K., Fiske, B., Sutherland, M., Xiromerisiou, G., Myers, R. H., Clark, L. N., Stefansson, K., Hardy, J. A., Heutink, P., Chen, H., Wood, N. W., Houlden, H., Payami, H., Brice, A., Scott, W. K., Gasser, T., Bertram, L., Eriksson, N., Foroud, T., and Singleton, A. B. (2014) Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease, *Nat. Genet.*, **46**, 989-993, doi: 10.1038/ng.3043.
114. Nalls, M. A., Plagnol, V., Hernandez, D. G., Sharma, M., Sheerin, U. M., Saad, M., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Lesage, S., Sveinbjörnsdóttir, S., Stefansson, K., Martinez, M., Hardy, J., Heutink, P., Brice, A., Gasser, T., Singleton, A. B., and Wood, N. W. (2011) Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies, *Lancet*, **377**, 641-649, doi: 10.1016/s0140-6736(10)62345-8.
115. Pickrell, J. K., Berisa, T., Liu, J. Z., Séguirel, L., Tung, J. Y., and Hinds, D. A. (2016) Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits, *Nat. Genet.*, **48**, 709-717, doi: 10.1038/ng.3570.
116. Rodrigo, L. M., and Nyholt, D. R. (2021) Imputation and reanalysis of ExomeChip Data identifies novel, conditional and joint genetic effects on Parkinson's disease risk, *Genes*, **12**, 689, doi: 10.3390/genes12050689.
117. Lill, C. M., Roehr, J. T., McQueen, M. B., Kavvoura, F. K., Bagade, S., Schjeide, B. M., Schjeide, L. M., Meissner, E., Zauft, U., Allen, N. C., Liu, T., Schilling, M., Anderson, K. J., Beecham, G., Berg, D., Biernacka, J. M., Brice, A., DeStefano, A. L., Do, C. B., Eriksson, N., Factor, S. A., Farrer, M. J., Foroud, T., Gasser, T., Hamza, T., Hardy, J. A., Heutink, P., Hill-Burns, E. M., Klein, C., Latourelle, J. C., Maraganore, D. M., Martin, E. R., Martinez, M., Myers, R. H., Nalls, M. A., Pankratz, N., Payami, H., Satake, W., Scott, W. K., Sharma, M., Singleton, A. B., Stefansson, K., Toda, T., Tung, J. Y., Vance, J., Wood, N. W., Zabetian, C. P., Young, P., Tanzi, R. E., Khoury, M. J., Zipp, F., Lehrach, H., Ioannidis, J. P., and Bertram, L. (2012) Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: the PDGene database, *PLoS Genet.*, **8**, e1002548, doi: 10.1371/journal.pgen.1002548.
118. Do, C. B., Tung, J. Y., Dorfman, E., Kiefer, A. K., Drabant, E. M., Francke, U., Mountain, J. L., Goldman, S. M., Tanner, C. M., Langston, J. W., Wojcicki, A., and Eriksson, N. (2011) Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease, *PLoS Genet.*, **7**, e1002141, doi: 10.1371/journal.pgen.1002141.
119. Spencer, C. C., Plagnol, V., Strange, A., Gardner, M., Paisan-Ruiz, C., Band, G., Barker, R. A., Bellenguez, C., Bhatia, K., Blackburn, H., Blackwell, J. M., Bramon, E., Brown, M. A., Brown, M. A., Burn, D., Casas, J. P., Chinnery, P. F., Clarke, C. E., Corvin, A., Craddock, N., Deloukas, P., Edkins, S., Evans, J., Freeman, C., Gray, E., Hardy, J., Hudson, G., Hunt, S., Jankowski, J., Langford, C., Lees, A. J., Markus, H. S., Mathew, C. G., McCarthy, M. I., Morrison, K. E., Palmer, C. N., Pearson, J. P., Peltonen, L., Pirinen, M., Plomin, R., Potter, S., Rautanen, A., Sawcer, S. J., Su, Z., Trembath, R. C., Viswanathan, A. C., Williams, N. W., Morris, H. R., Donnelly, P., and Wood, N. W. (2011) Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of SNCA and multiple associated haplotypes at 17q21, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 345-353, doi: 10.1093/hmg/ddq469.

GENETIC ARCHITECTURE OF PARKINSON'S DISEASE

Review

M. I. Shadrina* and P. A. Slominsky

*Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; e-mail: shadrina@img.ras.ru*

Year 2022 marks the 25th anniversary of the first mutation in familial autosomal dominant Parkinson's disease. Over the years, our understanding of the role of genetics in the pathogenesis of familial and idiopathic

forms of Parkinson's disease has expanded significantly — a number of genes for the familial form of the disease have been identified, and DNA markers of an increased risk of developing a sporadic form of the disease have been identified. But, despite all the successes achieved, we are far from an accurate assessment of the contribution to the development of the disease as a whole, both genetic factors and (and even more so) epigenetic factors. The review summarizes the information accumulated to date on the genetic architecture of Parkinson's disease and formulates issues that need to be addressed and are primarily related to the assessment of epigenetic factors in the pathogenesis of the disease.

Keywords: Parkinson's disease, monogenic form, sporadic form, genetics, mutation analysis, genome-wide association analysis, epigenetics, genetic risk